

Institut für Labortierkunde
Veterinärmedizinische Fakultät der Universität Zürich
Direktor: Prof. Dr. Kurt Bürki

Angefertigt unter Leitung von Dr. Frank Bootz

Helicobacter-Infektionen bei Nagern: Etablierung neuer real-time PCR Assays, Kultivierung und Infektionsversuche mit ausgewählten Helicobacter-Stämmen

INAUGURAL DISSERTATION
zur Erlangung der Doktorwürde der
Veterinärmedizinischen Fakultät
der Universität Zürich

Vorgelegt von
Gregor Fischer
Tierarzt aus Siegburg, D

Genehmigt auf Antrag von
Prof. Dr. Kurt Bürki, Referent
Prof. Dr. Max M. Wittenbrink, Korreferent

Zürich 2004

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	7
1.1	Allgemeine Problemstellung.....	7
1.2	Ziele dieser Arbeit.....	9
1.3	Anmerkungen zu den Versuchen.....	9
2	ERREGER	11
2.1	Helicobacter hepaticus.....	11
	Morphologie und Kulturbedingungen	11
	Biochemische Eigenschaften	11
	Vorkommen und pathologisches Potential	11
	Nachweismethoden.....	12
2.2	Helicobacter bilis.....	12
	Morphologie und Kulturbedingungen	12
	Biochemische Eigenschaften	12
	Vorkommen und pathologisches Potential	13
	Nachweismethoden.....	13
2.3	Helicobacter muridarum	13
	Morphologie und Kulturbedingungen	13
	Biochemische Eigenschaften	14
	Vorkommen und pathologisches Potential	14
	Nachweismethoden.....	14
2.4	Helicobacter cinaedi.....	14
	Morphologie und Kulturbedingungen	14
	Biochemische Eigenschaften	15
	Vorkommen und pathologisches Potential	15
	Nachweismethoden.....	15
2.5	Helicobacter cholecystus.....	15
	Morphologie und Kulturbedingungen	15
	Biochemische Eigenschaften	16
	Vorkommen und pathologisches Potential	16
	Nachweismethoden.....	16
2.6	Helicobacter pylori.....	16
	Morphologie und Kulturbedingungen	16
	Biochemische Eigenschaften	17
	Vorkommen und pathologisches Potential	17
	Nachweismethoden.....	17
3	MATERIAL UND METHODEN	18
3.1	Material.....	18
3.1.1	Herkunft der Helicobacter spp.	18
3.1.2	Nährmedien für die Kultivierung	18
3.1.3	Inkubator, Anaerobengefaß und Gasgemisch.....	19
3.1.4	Herkunft und Haltungsbedingungen der Versuchstiere.....	19
3.1.5	DNA-Extraktions-Kit	19

3.2	Methoden	20
3.2.1	Anzucht der <i>Helicobacter</i> spp.	20
3.2.2	Extraktion und Quantifizierung der DNA	21
3.2.3	Konventionelle PCR.....	22
3.2.4	Real-time PCR mit dem TaqMan®	24
3.2.5	Serologischer Nachweis mit ELISA.....	33
3.2.6	Versuch 1: Erregerpathogenität und minimale infektiöse Dosis	35
3.2.7	Versuch 2: Zeitlicher Verlauf der Infektion	38
4	RESULTATE	40
4.1	Konventionelle PCR.....	40
4.1.1	Genus-spezifische PCR	40
4.1.2	Spezies-spezifische PCR	41
4.2	Real-time PCR.....	42
4.2.1	Genus-spezifische real-time PCR.....	42
4.2.2	Spezies-spezifische real-time PCR.....	44
4.3	Versuch 1: Erregerpathogenität und minimale infektiöse Dosis	52
4.3.1	Ergebnisse der real-time PCR nach 42 Tagen nach Inokulation	52
4.3.2	Ergebnisse der Histopathologie nach 42 Tagen	54
4.4	Versuch 2: Zeitlicher Verlauf der Infektion mit 10⁸ Erregern.....	56
4.4.1	Ergebnisse der real-time PCR	56
4.4.2	Ergebnisse der Serologie der Sentinels	60
5	DISKUSSION	61
5.1	Vergleich der konventionellen PCR mit der real-time PCR	61
5.2	Ermittlung der minimalen infektiösen Dosis	62
5.3	Diagnostische Möglichkeiten der Histopathologie	63
5.4	Zeitlicher Verlauf der Infektion	64
5.5	Serologie als Nachweismethode	66
5.6	Schlussfolgerungen.....	67
6	ANHANG: ERGEBNISSTABELLEN.....	69
6.1	Versuch 1: Erregerpathogenität und minimale infektiöse Dosis	69
6.2	Versuch 2: Zeitlicher Verlauf der Infektion	76
7	LITERATURVERZEICHNIS	94

Abstract

Several publications in the past few years have emphasized the impact of the genus *Helicobacter* spp. on research results and pointed out the importance of a fast and reliable diagnostic assay.

In this study a genus-specific and five species-specific real-time PCR assays were developed, all of them turned out to be very specific and sensitive. The comparison between the data obtained with the real-time PCR and other diagnostic methods indicated that the histopathological detection of *Helicobacter* spp. is not adequate, mainly due to the low sensitivity and specificity of the assay. ELISA was less sensitive than real-time PCR and additionally its dependence on the immunological system of the animals makes this test inadequate for the analysis of immunocompromized mice.

After inoculation of *Helicobacter* spp. in mice it was possible to detect by real-time PCR the presence of the bacteria already after two days in the caecum, and after four days in the feces of the animals. Moreover, this work confirms that sentinel animals after 40 days of exposition to inoculated animals show clearly positive results in the serological analysis by ELISA as well as in the real time PCR from DNA extracted from feces.

This work presents fast, very sensitive and specific real-time PCR assays for the detection of *Helicobacter* spp. and indicates, that it is possible to completely replace diagnostic necropsy by real-time PCR-analysis of feces. This non-invasive method is in concordance with the 3R principles and allows a reliable detection of *Helicobacter* spp. without the need of sacrificing the animals.

Zusammenfassung

Nachdem in der Vergangenheit bereits von vielen Autoren der mögliche Einfluss der Gattung *Helicobacter* spp. auf Versuchsergebnisse beschrieben wurde, hat die *Helicobacter*-Diagnostik zunehmend an Bedeutung gewonnen.

In dieser Arbeit werden ein Genus-spezifischer, sowie fünf Spezies-spezifische real-time PCR Assays für die Gattung *Helicobacter* vorgestellt. Die Assays zeigten sich in allen Fällen als sehr sensitiv und spezifisch. Vergleiche mit anderen Nachweismethoden ergaben, dass der histopathologische Nachweis aufgrund seiner geringen Sensitivität und Spezifität für *Helicobacter*-Diagnostik nicht geeignet ist. Der ELISA zeigte sich weniger sensitiv als die real-time PCR und ist zudem von der Immunitätslage des Tieres abhängig und somit bei immundefizienten Tieren nicht einsetzbar.

Im Tierversuch konnte gezeigt werden, dass *Helicobacter* spp. mittels real-time PCR bereits nach zwei Tagen im Caecum und nach vier Tagen im Kot nachweisbar waren. Damit ist im Sinne der 3R-Philosophie ein zuverlässiger und frühzeitiger Erregernachweis ohne Euthanasie möglich. Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass nach etwa 40 Tagen *Helicobacter*-Infektionen in Sentinel-Mäusen sowohl serologisch, als auch über die real-time PCR im Kot nachgewiesen werden können.

Abkürzungsverzeichnis:

A ₂₆₀	Absorption bei 260nm
bp	Basenpaar
C _T , C _t	Threshold Cycle; Zyklus, ab dem ein signifikanter Anstieg des Reporter-Signals zu beobachten ist
DNS, DNA	D esoxyribonucleinsäure, D esoxyribonucleinacid
DNA _c	DNA-Konzentration
dsDNA	Doppelsträngige DNA
ELISA	E nzyme- l inked- i mmunosorbent- a ssay
FAM	6-Carboxy-Fluoreszein
FELASA	F ederation of E uropean L aboratory A nimal S cience A ssociations
FRET	F luorescence R esonance E nergie T ransfer
G/C	Prozentuales Verhältnis von Guanin zu Cytosin
IBD	I nflammatory B owel D isease
IVC	I ndividually- v entilated- c age
M	Molar
mol	Mol
NTC	N o T emplate C ontrol
OD ₂₆₀	Optische Dichte bei 260nm
PBS	P hosphated- B uffered- S aline-solution
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
ROX	6-Carboxyrhodamin
3R	R educe, R efine, R epace
SPF	S pezifiziert p athogenfrei
TAMRA	6-Carboxy-Tetramethyl-Rhodamin
TEM	T ransmissions- E lektronen- M ikroskop
T _m	Schmelzpunkt
UNG	U racil- N - G lykosylase
ΔR _n	ΔR _n =(R _n ⁺) - (R _n ⁻); entspricht der Intensität des Reporter-Signals

1 Einleitung

1.1 Allgemeine Problemstellung

Tierversuche müssen unter standardisierten Bedingungen ablaufen, um vergleichbar und reproduzierbar zu sein. Gleichzeitig können mit der Standardisierung auch wichtige Ziele des Tierschutzes wie Reduktion der eingesetzten Tierzahlen, Reduktion der Belastung während des Versuchs und Sicherung eines definierten Hygienestatus umgesetzt werden. Ein definierter Hygienestatus der Versuchstiere ist also ein unabdingbarer Bestandteil des Versuchs und führt letztlich, über eine geringere Streuung der Versuchsergebnisse, zu reduzierten Versuchstierzahlen. In der Nagerdiagnostik findet sich eine Vielzahl zuverlässiger PCR Assays für den Nachweis diverser viraler und bakterieller Erreger, wobei für die *Helicobacter*-Diagnostik noch Nachholbedarf besteht.

Nachdem im Jahre 1983 *Helicobacter pylori* (Marshall and Warren, 1984) als humanpathogener Erreger aus dem Magen des Menschen isoliert wurde, sind bis heute bei zahlreichen Säugetieren und Vögeln (Dewhirst et al., 1994) *Helicobacter* spp. aus unterschiedlichen Organen isoliert worden. Inwieweit diese Bakterien zur normalen Darmflora bei Nagern gehören, ist bis heute nicht vollständig geklärt.

Helicobacter spp. sind gramnegative, mikroaerophile, gebogene bis spiralförmige Bakterien, welche für gewöhnlich den Gastrointestinaltrakt von Menschen und Säugetieren besiedeln. Infektionen mit *Helicobacter* spp. können in Labornagern zu verschiedenen Krankheitsbildern führen, wobei es in Abhängigkeit des Nagerstammes zu unterschiedlich ausgeprägten Symptomen kommen kann. *H. bilis* führt beispielsweise in C.B-17-scld Mäusen zu proliferativer Typhlitis und chronisch aktiver Hepatitis (Franklin et al., 1998), in Tac:Icr:Ha(ICR)-scldfDF Mäusen zu Inflammatory Bowel Disease (IBD) (Shomer et al., 1997). In SCID/NCr Mäusen führten Infektionen mit *H. hepaticus* zu Hepatitis, proliferativer Typhlitis, sowie zu Colitis (Li et al., 1998), während sich C57BL/6NCr Mäuse resistent in Bezug auf Hepatitiden zeigten (Ward et al., 1996).

In den meisten Fällen verlaufen Infektionen in immunkompetenten Tieren ohne klinisch erkennbare Symptome (Beckwith et al., 1997). Dies führt häufig in der Forschung zu Problemen, da auch durch symptomlose Infektionen Versuchsergebnisse beeinflusst werden können (Ward et al., 1994). Im Herbst 1992 wurde am National Cancer Institute's Frederick Cancer Research and Development Center (NCI-FCRDC) in Frederick, Maryland, eine toxikologisch-onkologische Langzeitstudie mit einer Kontrollgruppe von A/JCr Mäusen durchgeführt, welche unter pathogenfreien Konditionen gehalten

wurden. Aufgrund einer zunächst unerkannten *Helicobacter hepaticus* Infektion entwickelten die Tiere mit fortschreitendem Versuchsverlauf eine chronisch aktive Hepatitis, sowie hepatozelluläre Tumoren (Ward et al., 1994).

Dies ist ein Beispiel dafür, welche Auswirkung eine unerkannte *Helicobacter* Infektion auf das Versuchsergebnis haben kann und wie essentiell die genaue Kenntnis des Hygienestatus der eingesetzten Tiere ist. Es sind noch nicht alle möglichen Auswirkungen auf Forschungsergebnisse geklärt, jedoch zeigt sich bereits jetzt, dass *Helicobacter* ein ernstzunehmender Faktor im Experiment sein kann. WARD ET AL. berichteten, dass Infektionen mit *Helicobacter hepaticus* Einflüsse auf die Menge von Serum-Enzymen und die Zusammensetzung von Gallensäuren haben können (Ward et al., 1994). TAYLOR ET AL. zeigten die Einflüsse der hepatotoxischen Substanzen von *Helicobacter hepaticus* auf toxikologische Studien auf (Taylor et al., 1995). Aus dem Bereich der Onkologie berichteten FOX ET AL. über die Einflüsse, welche die Bildung spontaner Hepatome auf die experimentelle Onkologie haben können (Fox et al., 1996). DIWAN ET AL. beobachteten das erhöhte Auftreten hepatozellulärer Adenome, welche die Bildung von Lebertumoren beschleunigten und zu einem erhöhten Auftreten von Leberläsionen führten (Diwan et al., 1997).

Da die *Helicobacter* spp. spezielle Anforderungen an Nährböden und Kulturmilieu stellen, ist eine Kultivierung zu diagnostischen Zwecken kosten- und arbeitsintensiv. In der Routinediagnostik hat sich die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) mittlerweile zum Standard etabliert, jedoch gibt es zur Zeit keine international anerkannten, standardisierten PCR-Assays. Tierhaltungen testen ihre Tiere nach unterschiedlichen, publizierten und in der Regel nicht validierten Protokollen. Dies führt häufig dazu, dass durch den Versender durchgeführte Untersuchungen vom Empfänger angezweifelt werden und erneut überprüft werden müssen.

Wenngleich sich die konventionelle PCR in den letzten Jahren als sichere und schnelle Methode etabliert hat, so haben weiterentwickelte Techniken wie z.B. die real-time PCR (Heid et al., 1996) wichtige Vorteile aufzuweisen. Bei der konventionellen PCR müssen die Produkte der PCR, die Amplikons, über den zusätzlichen Schritt der Gelelektrophorese, sichtbar gemacht werden. Hierdurch steigen der Laboraufwand und letztlich auch die Gefahr einer „Carry-Over“-Kontamination an. Bei der real-time PCR entfällt dieser Schritt vollständig. Durch ein zusätzliches Oligonukleotid, welches zwischen Forward-Primer und Reverse-Primer positioniert wird, die sog. TaqProbe[®], erreicht die real-time PCR gegenüber der konventionellen PCR zudem eine höhere Spezifität. Der sicherlich wichtigste Unterschied besteht jedoch in der Möglichkeit, eine quantitative Aussage über die ursprünglich

eingesetzte Menge an DNA machen zu können. Dadurch werden Rückschlüsse auf die Erregerdichte bei einer Infektion mit *Helicobacter* möglich.

1.2 Ziele dieser Arbeit

Es sollen in dieser Arbeit anhand von Sequenzdaten neue real-time PCR Assays für die *Helicobacter*-Spezies *H. hepaticus*, *H. bilis*, *H. muridarum*, *H. cinaedi*, *H. pylori*, sowie ein neuer und zuverlässiger, Genus-spezifischer real-time PCR Assay entwickelt werden. In einem Vergleich werden die entwickelten real-time PCR Assays, bestehenden konventionellen PCR's, sowie histopathologischen und serologischen (ELISA) Untersuchungen gegenübergestellt. Die für die Etablierung der real-time PCR Assays benötigte Erreger-DNA sollen aus selbst angezüchteten *Helicobacter*-Stämmen extrahiert werden, damit ebenfalls die optimalen Kulturbedingungen eruiert werden können.

Um aussagekräftige Untersuchungsergebnisse zu erhalten, ist neben einer zuverlässigen Nachweismethode auch die Kenntnis der geeigneten Probenahmestellen erforderlich. Aus diesem Grund soll in zwei Infektionsversuchen einerseits die minimale infektiöse Dosis von drei ausgewählten *Helicobacter*-Spezies ermittelt und andererseits der zeitliche Infektionsverlauf über die Dauer von 40 Tagen überprüft werden. Hierbei soll geklärt werden, wie lange *H. hepaticus*, *H. bilis* und *H. muridarum* passagieren um ihr Zielorgan zu erreichen, welche Organe sie dabei streifen und welche Manifestationsorgane sich für die Probenahme als geeignet erweisen. Schließlich soll durch die Einbeziehung einer Kotuntersuchung überprüft werden, ob die DNA-Extraktion aus Kot hinreichend sensitiv ist, um eine Organentnahme (Ganztieruntersuchung) aus diagnostischen Gründen umgehen zu können.

Um die Übertragbarkeit von *Helicobacter*-Infektionen einschätzen zu können, werden immunkompetente und immundefiziente Sentinel-Mäuse gemeinsam mit infizierten Mäusen gehalten und so einem für Tierhaltungen typischen Infektionsdruck ausgesetzt. In definierten zeitlichen Abständen werden die Sentinels schließlich serologisch und mit Hilfe der entwickelten real-time PCR Assays auf eine Erregerpräsenz hin untersucht.

1.3 Anmerkungen zu den Versuchen

Für die Beurteilung der Sensitivitätsunterschiede zwischen der konventionellen und der real-time PCR werden für das Genus *Helicobacter*, sowie die Spezies *H. hepaticus*, *H. bilis* und *H. muridarum* bereits etablierte konventionelle Protokolle eingesetzt. Für *H. pylori* wurde bereits eine konventionelle PCR

publiziert (Bohr et al., 2002), jedoch deren Nachweisgrenze von 0,1pg in dieser Arbeit nicht erneut überprüft. Für die übrigen Vertreter *H. cinaedi* und *H. muridarum* stehen nach heutigem Kenntnisstand nur indirekte, konventionelle PCR's zur Verfügung, welche entweder den Nachweis über Restriktionsenzyme oder über eine Sequenzierung des PCR-Produktes erforderlich machen. Aus diesem Grunde werden diese Protokolle nicht in den Vergleich mit einbezogen.

Neben den zur Validierung der real-time PCR's erforderlichen *Helicobacter*-Spezies, wird zusätzlich *Helicobacter cholecystus* angezüchtet. Hierbei soll einerseits dessen Anzüchtbarkeit überprüft und andererseits das *Helicobacter*-Repertoire vergrößert werden um möglichst viele *Helicobacter*-Spezies für die Spezifitäts-Tests der einzelnen real-time PCR Assays zur Verfügung zu haben.

2 Erreger

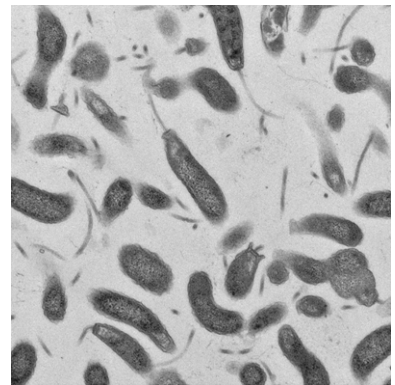
(Die Abbildungen der einzelnen Erreger wurden vom Institut für Anatomie der Universität Zürich mit einem Transmissions-Elektronen-Mikroskop (TEM) angefertigt. Die Dimensionen der Erreger sind im Text vermerkt.)

2.1 *Helicobacter hepaticus*

Erstbeschreiber: Fox ET AL. (Fox et al., 1994)

Morphologie und Kulturbedingungen

H. hepaticus ist ein bewegliches, gramnegatives, gebogenes bis spiralförmiges Bakterium mit einer Länge von 1,5 bis 5,0µm und einer Breite von 0,2 bis 0,3µm. Je nach Form und Größe erkennt man 1 bis 3 schraubenförmige Windungen. An beiden Polen findet sich jeweils eine Flagelle.



Die Anzüchtung erfolgt nach 3 bis 7-tägiger Inkubation unter anaeroben oder mikroaerophilen Bedingungen (90% N₂, 5% H₂ und 5% CO₂) auf Agar, wobei sich letztere in dieser Arbeit als ergiebiger erwiesen haben.

Wachstum wird bei 37°C, nicht jedoch bei 25°C oder 42°C beobachtet. Zunächst bilden sich kleine Einzelkolonien aus, welche sich jedoch nach kurzer Zeit filmartig über das gesamte Medium ausbreiten. Als Wachstumsmedien eignen sich beispielsweise Columbia-Blut-Agar, Trypticase-Soja-Blut-Agar oder Brucella-Blut-Agar mit Trimetoprim, Vancomycin und Polymyxin (TVP) (Fox et al., 1994).

Biochemische Eigenschaften

H. hepaticus ist Oxidase- und Katalase-positiv und zeigt eine starke Urease Aktivität. Das Bakterium produziert H₂S und reduziert Nitrat zu Nitrit (Fox et al., 1994).

Vorkommen und pathologisches Potential

A/JCr, C3H/HeNcr, SJL/Ncr, BALB/cAnNcr und SCID/Ncr-Mäuse zeigen nach einer Infektion unterschiedlich stark ausgeprägte Formen von Hepatitis und hepatozelluläre Neoplasien, während C57Bl/6Ncr, B6C3F1 und Nacktmäuse nur sehr geringe oder keine histologischen Veränderungen in der Leber aufweisen (Zenner, 1999). In den empfindlichen Stämmen entwickeln männliche Tiere früher und ausgeprägter histologische Veränderungen als weibliche Tiere (Li et al., 1998). In Infektionsversuchen mit Ratten, Meerschweinchen und syrischen Hamstern konnten keine histologischen Veränderungen nachgewiesen werden. Mit Ausnahme des Mausstammes AKR/Ncr

wurden keine Gastritiden beobachtet. Natürlich infizierte SCID/NCr-Mäuse zeigten proliferative Typhlitis (Li et al., 1998) in hoher Inzidenz, während andere Stämme hingegen nur in seltenen Fällen. Untersuchungen von WARD ET AL. zeigten auf, dass immundefiziente Nackt- und SCID-Mäuse, unterschiedlichen genetischen Ursprungs, an der Large Bowel Disease erkrankten (klinisch über einen Rektalprolaps diagnostiziert), während dies bei immunkompetenten Tieren nie der Fall war (Ward et al., 1996). Von den murinen *Helicobacter* spp. scheint *H. hepaticus* zur Zeit die einzige Spezies zu sein, welche auch in immunkompetenten Tieren zu klinischen Symptomen führt.

Nachweismethoden

PCR (Battles et al., 1995; Shames et al., 1995)

ELISA (Livingston et al., 1997)

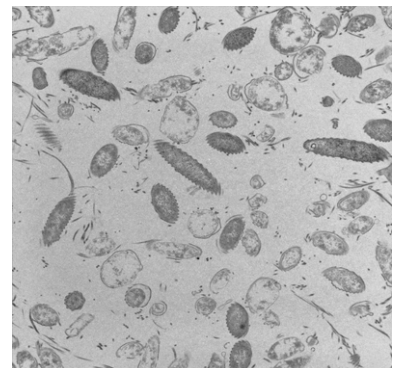
2.2 *Helicobacter bilis*

Erstbeschreiber: (Fox et al., 1995)

Morphologie und Kulturbedingungen

Die Zellen sind spindelförmig und messen etwa 4-5µm in der Länge und 0,5µm in der Breite. An beiden Polen finden sich zwischen 3 und 14 Flagellen. In älteren Kulturen findet man häufig kokkoide Formen. *Helicobacter bilis* ist gramnegativ und beweglich.

Nach 3-7 -tägiger Inkubation unter mikroaerophilen Bedingungen (90% N₂, 5% H₂ und 5% CO₂) bei 37°C, bildet sich ein dünner Bakterienfilm auf dem Agar. Wachstum wird auch bei 42°C, nicht jedoch bei 25°C beobachtet. Als Kulturmedien eignen sich Trypticase-Soja-Blut-Agar oder Brucella-Blut-Agar mit TVP (Fox et al., 1995).



Biochemische Eigenschaften

Helicobacter bilis besitzt eine starke Urease-Aktivität und ist Oxidase- und Katalase-positiv. Er produziert H₂S und reduziert Nitrat zu Nitrit. Hämolyse auf Blut-Agar wurde nicht beobachtet (Fox et al., 1995).

Vorkommen und pathologisches Potential

Helicobacter bilis führt, abhängig vom jeweiligen genetischen Hintergrund des Wirtes, zu unterschiedlich ausgeprägten histopathologischen Veränderungen in der Leber und im Darmtrakt. Bei den von FOX ET AL. beobachteten Läsionen, handelte es sich um mononukleäre und polymorphnukleäre Leukozyteninfiltrationen, welche bei CBA/CA Mäusen am schwerwiegendsten, bei DBA/2 Mäusen weniger schwerwiegend und bei C57BL/6 Mäusen mild ausgeprägt waren. BALB/c Mäuse zeigten keinerlei Entzündungsmerkmale (Fox et al., 1995). Intraperitoneal infizierte Tac:Icr:Ha(ICR)-scidfD Mäuse mit einer definierten Flora, erkrankten ausnahmslos an einer unterschiedlich stark ausgeprägten Inflammatory Bowel Disease (IBD) (Shomer et al., 1997). HAINES ET AL. zeigten auf, dass natürlich und experimentell infizierte immundefiziente Nacktratten (Cr:NI-rnu) ebenfalls an der IBD erkrankten, wobei in seinen Versuchen ausschließlich männliche Ratten betroffen waren (Haines et al., 1998).

Nachweismethoden

PCR (Franklin et al., 1998)

ELISA (Feng et al., 2002; Hodzic et al., 2001)

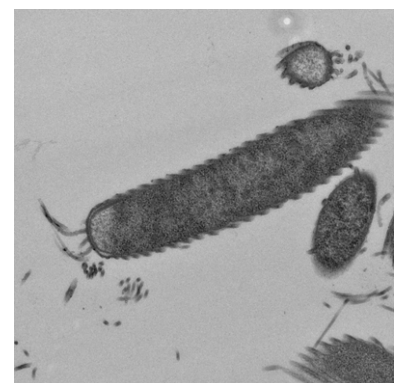
2.3 *Helicobacter muridarum*

Erstbeschreiber: (Lee et al., 1992)

Morphologie und Kulturbedingungen

Gramnegative, schraubenförmige Zellen mit 2-3 Windungen. Ihre Länge variiert zwischen 3,5-5µm, ihre Breite zwischen 0,5-0,6µm. Ältere Kulturen besitzen oft kugelförmige Zellen mit einem Durchmesser von 2-4µm. *Helicobacter muridarum* ist beweglich und trägt an beiden Zellpolen jeweils 10-14 Flagellen.

Die Anzüchtung erfolgt in mikroaerophilem Milieu bei 1-16% O₂ und 5-10% CO₂. Unter aeroben oder anaeroben Bedingungen wird kein Wachstum beobachtet. Nach 2-3 Tagen bei 37°C bildet sich auf dem Kulturmedium ein feiner Bakterienfilm. Bei 25°C oder 42°C findet kein Wachstum statt. Als Wachstumsmedien eignen sich mit Blut oder Serum angereicherte Agar-Medien, wobei eine feuchte Umgebung das Wachstum verbessert (Lee et al., 1992).



Biochemische Eigenschaften

Helicobacter muridarum ist Oxidase-, Katalase- und Urease-positiv. Das Bakterium produziert kein H₂S und reduziert kein Nitrat zu Nitrit (Lee et al., 1992).

Vorkommen und pathologisches Potential

LEE ET AL. konnten *Helicobacter muridarum* sowohl aus dem Intestinaltrakt als auch aus dem Magen von Mäusen und Ratten isolieren (Lee et al., 1992). JIANG ET AL. zeigten, dass *Helicobacter muridarum* in Verbindung mit CD4⁺ CD45RB^{high} T-Zellen bei C.B17 SCID-Mäusen eine Inflammatory Bowel Disease provoziert (Jiang et al., 2002). QUEIROZ ET AL. beschrieben 1992 ein Bakterium (mit hoher Wahrscheinlichkeit handelte es sich dabei um *H. muridarum*), welches aus dem Magen, der Ileum- und Zäkumschleimhaut, sowie aus dem Kot von Mäusen isoliert werden konnte. Während die Darmmukosa keine Veränderungen aufwies, wurde in Zusammenhang mit *H. muridarum* ein signifikantes Auftreten von Gastritiden beobachtet (Queiroz et al., 1992).

Nachweismethoden

PCR (Riley et al., 1996)

ELISA (R. Boot, persönliche Mitteilung)

2.4 *Helicobacter cinaedi*

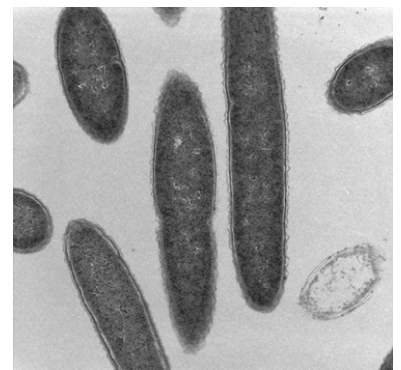
Erstbeschreiber: (Totten et al., 1985)

Morphologie und Kulturbedingungen

Das Erscheinungsbild von *Helicobacter cinaedi* variiert zwischen leicht gebogenen, S-förmigen oder den eher selteneren, fast geraden Formen mit einer Länge von 1,5-5,0µm und einer Breite von 0,3-0,5µm. Ältere Kolonien neigen zur Ausbildung kokkoider Formen. Die Zellen sind beweglich und mit 1-2 Flagellen an beiden Zellpolen ausgestattet.

Unter mikroaerophilen Kulturbedingungen (5% O₂, 3,5% CO₂, 7,5% H₂, 84% N₂) (Vandamme et al., 2000) können auf bluthaltigen Nährmedien

mit Schaf- oder Pferdeblut nach etwa 48 Stunden kleine, durchscheinende Kolonien beobachtet werden. Nach etwa 72 Stunden werden die Kolonien milchig und besitzen einen Durchmesser von weniger als 1mm. Auf frischen Nährböden wird mitunter auch ein filmartiges Wachstum beobachtet. Bei 25 °C,



sowie unter aeroben Bedingungen wird kein Wachstum beobachtet. Geringes Wachstum findet auch noch bei 42 °C oder unter anaeroben Bedingungen statt (Totten et al., 1985).

Biochemische Eigenschaften

H. cinaedi ist Katalase und Oxidase positiv und besitzt eine Urease. Das Bakterium produziert kein H₂S. Nitrat wird zu Nitrit reduziert (Totten et al., 1985).

Vorkommen und pathologisches Potential

Helicobacter cinaedi wurde erstmals aus einem Rektalabstrich bei männlichen homosexuellen Patienten isoliert (Totten et al., 1985). Dabei fiel auf, dass *H. cinaedi* viel häufiger aus männlichen Homosexuellen mit intestinaler Symptomatik, als aus homosexuellen oder heterosexuellen Patienten ohne intestinaler Symptomatik isoliert werden konnte. GEBHART ET AL. zeigten, dass etwa 75% der in ihrer Studie untersuchten Hamster mit *H. cinaedi* infiziert waren und wiesen darauf hin, dass dieses Bakterium möglicherweise zur Normalflora bei Hamstern zählt und diese Tiere ein natürliches Reservoir darstellen (Gebhart et al., 1989). Neben Mensch und Hamster wurden auch Isolate aus Rhesusaffen, Hunden, Füchsen, Katzen und Ratten beschrieben. Unter den Tieren zeigten ausschließlich Rhesusaffen nach experimenteller Infektion milde klinische Symptome in Form von Kot weicherer Konsistenz. FOX ET AL. schließen nicht aus, dass *Helicobacter cinaedi* eine Mitbeteiligung an der Entwicklung einer Hepatitis beim Menschen und diversen Tierspezies hat.

Nachweismethoden

PCR (Kiehlbauch et al., 1995)

2.5 *Helicobacter cholecystus*

Erstbeschreiber: (Franklin et al., 1996)

Morphologie und Kulturbedingungen

Etwa 5% der Zellen sind 3,0-5,0µm lange und 0,5-0,6µm breite Stäbchen. Die Zellen sind gramnegativ und besitzen an einem Pol eine einzelne Flagelle. 95% der Kulturen weisen kokkoide Formen mit einem Durchmesser von 0,8-1,2µm auf.

Die Kolonien sind punktförmig und bilden sich unter anaeroben und mikroaerophilen (5% CO₂, 5% H₂, 90% N₂) Bedingungen bei 37°C und



42°C nach etwa 72 Stunden. Bei 25°C wird kein Wachstum beobachtet. Geeignete Kulturmedien sind beispielsweise Brucella-Blut-Agar oder andere mit Blut oder Serum angereicherte Medien (Franklin et al., 1996).

Biochemische Eigenschaften

Helicobacter cholecystus ist Oxidase- und Katalase-positiv, besitzt jedoch keine Urease. Nitrat wird zu Nitrit reduziert. Das Bakterium produziert kein H₂S (Franklin et al., 1996).

Vorkommen und pathologisches Potential

Neben *Helicobacter cinaedi* ist dies die zweite beim Hamster isolierte *Helicobacter*-Spezies. FRANKLIN ET AL. machten die wahrscheinliche Rolle von *H. cholecystus* in der Entstehung einer Cholangiofibrose, bzw. einer zentrolobulären Pankreatitis deutlich. Hamster bei denen diese *Helicobacter*-Spezies nachgewiesen werden konnte, zeigten in hohem Maße eine der beiden genannten Organveränderungen. Da einerseits *H. cholecystus* im Kot von Hamstern durch eine PCR nachgewiesen werden konnte und andererseits Hamster ein gemeinsames Mündungsstück für Gallengang und Pankreas besitzen, ist eine aufsteigende Infektion aus dem Darmlumen wahrscheinlich. Dies könnte die in hohem Maße konkurrierenden Veränderungen in Leber und Pankreas erklären (Franklin et al., 1996).

Nachweismethoden

PCR (Franklin et al., 1996)

2.6 *Helicobacter pylori*

Erstbeschreiber: (Marshall and Warren, 1984)

Morphologie und Kulturbedingungen

Helicobacter pylori ist ein gramnegatives, bewegliches, etwa 0,5µm breites und 3µm langes Stäbchen mit 4-6 unipolaren Flagellen. Es werden mitunter auch kokkoide Formen beobachtet. Nach 3 bis 5-tägiger Inkubation unter mikroaerophilen Bedingungen, bilden sich kleine Einzelkolonien aus. Wachstum wird bei 37°C, nicht jedoch bei 42°C beobachtet. Als Wachstumsmedien eignen sich beispielsweise Columbia-Blut-Agar, Trypticase-Soja-Blut-Agar, Brucella-Blut-Agar mit TVP oder speziell im Handel befindliche Pylori-Agar (Hachem et al., 1995).



Biochemische Eigenschaften

Helicobacter pylori ist Oxidase- und Katalase-positiv und besitzt eine Urease. Nitrat wird nicht zu Nitrit reduziert (Marshall and Warren, 1984).

Vorkommen und pathologisches Potential

Helicobacter pylori ist der Prototyp (Type Species) des Genus *Helicobacter*. Obwohl der Mensch und Affe als einzige natürliche Wirte gelten, sind Nachweismethoden in der Maus gleichfalls von Bedeutung, da mit *Helicobacter pylori* infizierte Mäuse häufig als Tiermodelle (Marchetti et al., 1995) in der Forschung eingesetzt werden. Es kann heute als gesichert gelten, dass *Helicobacter pylori* ein Schlüsselfaktor in der Entstehung peptischer Magengeschwüre, Magenkarzinome (Correa and Miller, 1995) und Mucous Membrane Associated Lymphoid Tissue-Lymphome (MALT-Lymphome) ist (Wotherspoon et al., 1993). Untersuchungen haben gezeigt, dass etwa 30-50% der Weltbevölkerung persistent mit *H. pylori* infiziert sind (Feldman et al., 1998).

Nachweismethoden

Mikrobiologischer Nachweis (Dent and McNulty, 1988; Goodwin et al., 1985)

Histologie

Urease-Schnelltest

Urease-Atmungstest (Debonnie et al., 1991; Graham et al., 1987)

PCR (Bohr et al., 2002; Mishra et al., 2002)

real-time PCR (He et al., 2002)

Serologie (Kosunen et al., 1992)

Stuhl-Antigentest

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Herkunft der *Helicobacter* spp.

Die für diese Arbeit benötigten *Helicobacter* spp. wurden über die BCCMTM / LMG Bacteria Collection (Universität Gent), dem Institut für Labortierkunde (Universität Zürich) und dem Central Institute for Experimental Animals (Kawasaki, Japan) bezogen.

Spezies	ATCC-Nr.	Herkunft
<i>H. bilis</i>	ATCC 51630	BCCM TM /LMG
<i>H. cinaedi</i>	ATCC 35683	BCCM TM /LMG
<i>H. muridarum</i>	ATCC 49282	BCCM TM /LMG
<i>H. hepaticus</i>	ATCC 51448	Institut für Labortierkunde
<i>H. pylori</i>	ATCC 43504	Institut für Labortierkunde
<i>H. cholecystus</i>	ATCC 700242, Hkb-1	Central Institute for Experimental Animals (Kawasaki, Japan)

Tabelle 3-1

3.1.2 Nährmedien für die Kultivierung

Nährmedien	Hersteller	Bezeichnung des Herstellers
Columbia-Agar mit 5% Schafblut	OXOID	PB 5039A
Columbia-Agar mit 5% Pferdeblut	BioMérieux	43050
Columbia-Agar mit 5% Schafblut	BioMérieux	43041
Trypticase-Soja-Agar mit 5% Schafblut	BioMérieux	43001
Pylori-Selektiv-Agar	BioMérieux	43263

Tabelle 3-2

3.1.3 Inkubator, Anaerobengefäß und Gasgemisch

Inkubator: Heraeus, Typ B6200 (Heraeus, D-6450 Hanau)

Gasgemisch: 10% H₂, 10% CO₂, Rest N₂ (Firma PanGas, Zürich)

Anaerobenbehälter: Anaerobic Jar, Typ HP011A (OXOID AG, Basel)



3.1.4 Herkunft und Haltungsbedingungen der Versuchstiere

Alle Tiere wurden über die Firma Taconic M&M (Bomholtvej 16, P.O. box 1079, DK-8680 Ry, Denmark) bezogen. Es handelte sich dabei um 5-6 Wochen alte SCID- (C.B.-Igh-1b/IcrTac-Prkdc scid) und NMRI-Mäuse mit SPF Status. Der Hygienestatus entsprach den Hygienerichtlinien der FELASA. Die Haltung erfolgte unter definierten Bedingungen. Die Raumtemperatur betrug 20°C, die Luftfeuchtigkeit lag bei 55% +/- 5%. Der Lichtzyklus war auf einen 12 Stunden Hell- Dunkelrhythmus eingestellt. Die Haltung erfolgte in Typ-3 IVC Käfigen mit einem 50-fachen Luftwechsel/h. Die Tiere wurden je nach Versuchsgruppe in unterschiedlich großen Gruppen gehalten. Als Käfigeinstreu kamen Tapvei Espen-Holzspäne (Tapvei-Oy, Kortteinen, 73620 Finnland) zum Einsatz. Das Futter (Nafag Ecosan, Promivi Kliba AG, Bahnhofplatz 9, CH-9200 Gossau; DVOD 10mm Mäuse-Ratten-Zuchtfutter) wurde über eine Dampfsterilisation im Tyndall-Verfahren bei 3bar, 110°C über 30min autoklaviert. Das Tränkewasser war mit 4ppm Chlor behandelt. Die wöchentliche Umsetzung der Tiere erfolgte in einer Sterilbank.

3.1.5 DNA-Extraktions-Kit

Zur DNA-Extraktion wurde der DNEasy[®] Tissue Kit der Firma Qiagen (Auf dem Wolf 39, CH-4052 Basel) eingesetzt. Das Probenmaterial wird zunächst mechanisch homogenisiert^a und anschließend enzymatisch lysiert. Zellkulturen können ohne mechanische Homogenisierung lysiert werden. Nach mehreren Waschvorgängen wird die extrahierte DNA an eine Membran gebunden und schließlich in einem darauffolgenden Eluationsschritt aus dieser ausgespült und aufgefangen. Die so gewonnene DNA wurde anschließend für die konventionelle PCR und den TaqMan[®] verwandt.

^a Tischrüttler, Fabrikat Retsch, Typ MM300; F. Kurt Retsch GmbH & Co. KG, 42781 Hahn, Deutschland

3.2 Methoden

3.2.1 Anzucht der *Helicobacter* spp.

Die bei -80°C in einem Glycerol-Stock tiefgefrorenen, aliquotierten Keime, wurden in einem auf 37°C temperierten Wasserbad aufgetaut und pro zu beimpfender Platte etwa 50µl Medium mit einer Pipette entnommen. Um mögliche zytotoxische Einflüsse des Einfriermediums auf die Keime gering zu halten, wurde die entnommene Keimmenge mit PBS etwa 1:100 verdünnt und anschließend zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und mit jeweils etwa 50µl der konzentrierten Lösung die Platten beimpft und mit einer Öse ausgestrichen. Bei der erstmaligen Anzucht wurde als Medium ein spezieller Pylori-Selektiv-Agar verwandt. Die im Agar befindlichen Antibiotika haben die Eigenschaft potentielle Begleitkeime in ihrem Wachstum zu hemmen.

Die so beimpften Platten wurden in ein Anaerobengefäß verbracht und zur Erhöhung der Luftfeuchtigkeit das Gefäß mit einem feuchten Schwämmchen versehen. Anschließend wurde über eine Unterdruckpumpe ein Teilvakuum erzeugt (ca. -0,6 bar) und danach das Gasgemisch bis zum Erreichen des Neutraldrucks eingeleitet. Um das Milieu möglichst genau einzustellen (10% H₂, 10% CO₂, Rest N₂) wurde dieser Vorgang jeweils 3-mal wiederholt. Je nach Keim wurden die Platten 3-5 Tage lang bei 37°C inkubiert und gegebenenfalls auf frisches Medium umgezüchtet.

Um mögliche Verunreinigungen und Kontaminationen ausschließen zu können, wurden die Kulturen regelmäßig überprüft. Die einzelnen Stämme wurden zunächst mikroskopisch hinsichtlich ihrer Morphologie bewertet. Anschließend wurde mittels einer Öse eine Probe entnommen und diese auf ihre biochemischen Eigenschaften hin untersucht. Die nachfolgende Tabelle gibt einen Überblick über die bei den untersuchten Spezies zu erwartenden biochemischen Eigenschaften. Schließlich wurde in Anlehnung an eine Arbeit von RILEY ET AL. über eine konventionelle, Genus-spezifische PCR, die Zugehörigkeit zum Genus *Helicobacter* überprüft (Riley et al., 1996).

<i>Spezies</i>	<i>Katalase</i>	<i>Oxidase</i>	<i>Urease</i>
H. bilis	⊕	⊕	⊕
H. hepaticus	⊕	⊕	⊕
H. muridarum	⊕	⊕	⊕
H. cinaedi	⊕	⊕	∅
H. cholecystus	⊕	⊕	∅
H. pylori	⊕	⊕	⊕

Tabelle 3-3: Die Tabelle gibt die Daten aus den jeweiligen Erstbeschreibungen wieder (siehe Einleitung)

3.2.2 Extraktion und Quantifizierung der DNA

Die Extraktion erfolgte mit dem DNEasy[®] Tissue Kit der Firma Qiagen und wurde laut Anweisung des Herstellers durchgeführt. Am Ende der Extraktion wurde die DNA 2-mal mit jeweils 200µl Puffer AE eluiert. Die gewonnene DNA wurde anschließend hinsichtlich ihrer Dichte spektrophotometrisch mit den Geräten GeneQuant^{®b} oder NanoDrop^{®c} gemessen und die Daten ausgewertet. Die gemessene Absorption bei 260nm ist der in der Probe vorhandenen DNA Menge direkt proportional. Um eine möglichst genaue Messung zu erhalten sollte dieser Wert zwischen 0,1 und 1,0^d liegen. Eine $A_{260} = OD_{260} = 1$ entspricht etwa 50µg/ml dsDNA. Daraus läßt sich folgende Beziehung ableiten:

$$DNA_c(\mu g/ml) = A_{260} \times 50 (\mu g/ml) \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

Um ebenfalls eine Aussage über die Reinheit der DNA machen zu können, wurde zusätzlich eine Messung bei 280nm durchgeführt. Da 260nm das Absorptionsmaximum der DNA und 280nm das Absorptionsmaximum für Proteine darstellt, läßt das Verhältnis A_{260}/A_{280} eine Aussage über die Verunreinigung der DNA mit Proteinen zu. Reine DNA hat ein Absorptionsverhältnis A_{260}/A_{280} von 1,7-1,9^e.

^b Pharmacia Biotech

^c NanoDrop[®] ND-1000 Spectrophotometer

^d Angaben der Firma Qiagen

^e Angaben der Firma Qiagen

3.2.3 Konventionelle PCR

3.2.3.1 Grundlagen der konventionellen PCR

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist eine In-vitro-Methode um spezifische DNA-Sequenzen zu vervielfältigen. Hierbei wird der zu amplifizierende Bereich, das Amplikon, durch einen Forward- und einen Reverse-Primer flankiert und von einem Enzym, der DNA-Polymerase, vervielfältigt. Die Methode basiert auf der wiederholten Abfolge verschiedener Temperaturzyklen bei denen nacheinander die Schritte Denaturierung, Anlagerung und Extension ablaufen. Jeder Zyklus verdoppelt die ursprünglich vorhandene Menge an Ziel-DNA. Da die amplifizierten Sequenzen wiederum selbst als Matrize für die Vervielfältigung dienen, können so innerhalb weniger Zyklen enzymatisch Milliarden von Kopien synthetisiert werden. Während die ursprünglich geringe DNA-Menge nicht direkt nachweisbar wäre, können die nun vervielfältigten Sequenzen über eine Gelelektrophorese aufgetrennt und sichtbar gemacht werden.

3.2.3.2 PCR Master Mix für die konventionelle PCR

Bestandteil	Volumina pro Reaktion	Endkonzentration
HotStarTaq Master Mix (Qiagen, Produkt-Nr. 203443)	12,5µl	
Forward Primer	0,4µl (200ng/µl)	0,5µM
Reverse Primer	0,4µl (200ng/µl)	0,5µM
Aqua dest.	8,7µl	
Template DNA	5,0µl	≤ 1µg pro Reaktion
Gesamtvolumen	25µl pro Reaktion	

Tabelle 3-4

Die Tabelle gibt einen exemplarischen Überblick über typische Komponenten und deren Konzentrationen in einem Master Mix. Sofern Protokolle von anderen Autoren eingesetzt wurden, sind deren Angaben entsprechend übernommen worden.

3.2.3.3 Protokoll für die konventionelle PCR

Schritt	Zeit	Temperatur	
Aktivierung	15 min	95°C	
Denaturierung	30 sec	94°C	} 40 Zyklen
Anlagerung	30 sec	(variabel) °C	
Polymerisierung	1 min	72°C	
Finale Polymerisierung	10 min	72°C	
→ Kühlung auf 4°C bis zur Entnahme und Lagerung bei -20°C			

Tabelle 3-5

Ebenso wie bei der Herstellung des PCR-Ansatzes, wurden die Protokolle entsprechend den Angaben der jeweiligen Autoren adaptiert. Die obenstehende Tabelle soll hierbei Beispielcharakter haben.

3.2.3.4 Gelelektrophorese

Als Elektrophoresegerät wurde das SEA 2000[®] der Firma Elchrom Scientific AG (Gewerbstrasse 8, CH-6330 Cham) eingesetzt. Das Gerätevolumen von 2 Litern wurde mit 0,75-fachem TAE-Puffer aufgefüllt und mit 100µl Ethidiumbromid (Fluka Chemie GmbH, CH-9471 Buchs, 10mg/ml) versetzt. Jeweils 3µl Probenmaterial wurden mit 3µl 2,5-fachem Ladungspuffer gemischt und auf ein Clearose[®] Gel BG Wide Mini S-52 geladen. Zur Verifizierung der Fragmentlängen wurde ein DNA Molecular Weight Marker (Firma Promega[®]) mit einer 100 bp - Leiter eingesetzt. Bei 120V und 200mA wurde das Gel nach 25min aus dem Gerät entnommen und kurz gespült. Das an die DNA-Fragmente gebundene Ethidiumbromid konnte anschließend auf einem Transluminator sichtbar gemacht und mittels einer Digitalkamera dokumentiert werden.

3.2.3.5 Primer-Sequenzen für die konventionelle PCR

Für die konventionelle PCR wurden folgende Primerpaare eingesetzt:

Bezeichnung	Richtung	Sequenz 5'-3'	Länge bp	% G/C	Tm ^f	Autor	Verwendung
H276f	Forward	5-CTA TGA CGG GTA TCC GGC-3	18	61	51,0°C	*	Genus
H676r	Reverse	5-ATT CCA CCT ACC TCT CCC A-3	19	53	50,0 °C	*	Genus
B38	Forward	5-GCA TTT GAA ACT GTT ACT CTG -3	21	38	49,0 °C	**	H. hepaticus
B39	Reverse	5-CTG TTT TCA AGC TCC CC-3	17	53	49,9 °C	**	H. hepaticus
C62	Forward	5-AGA ACT GCA TTT GAA ACT ACT TT-3	23	30	51,0 °C	***	H. bilis
C12	Reverse	5-GGT ATT GCA TCT CTT TGT ATG T-3	22	36	50,0 °C	***	H. bilis

Tabelle 3-6: * (Riley et al., 1996) ** (Shames et al., 1995) *** (Fox et al., 1995)

3.2.4 Real-time PCR mit dem TaqMan[®]

3.2.4.1 Grundlagen der real-time PCR

Die real-time PCR ermöglicht, im Gegensatz zur konventionellen PCR, sowohl eine qualitative, als auch eine quantitative Analyse des PCR-Produktes. Dies wird erreicht, indem zwischen Forward- und Reverse-Primer ein weiteres Oligonukleotid (Sonde, TaqProbe[®]) positioniert wird. Diese sog. TaqProbe[®] ist einer Sequenz des zu amplifizierenden DNA-Fragmentes komplementär. An ihren Enden ist die TaqProbe[®] mit 2 Fluoreszenzfarbstoffen, einem Reporter und einem Quencher, konjugiert. Beim TaqMan[®] handelt es sich um einen 96 Loch Thermocycler mit ebenso vielen Lichtwellenleitern. Über diese Lichtwellenleiter wird die TaqProbe[®] mit Laserlicht angeregt und das von den Fluoreszenzfarbstoffen emittierte Licht gemessen. Bei einer intakten TaqProbe[®] wird die Lichtenergie des Lasers vom Reporter auf den Quencher übertragen und dieser emittiert ein Lichtsignal charakteristischer Wellenlänge, welches alle 5 Sekunden im TaqMan[®] erfasst wird. Dieser Effekt des Energietransfers (FRET, Fluorescence Resonance Energy Transfer) tritt nur ein, wenn die beiden Farbstoffe einander benachbart sind. Da aber die Taq-Polymerase eine 5'-3' Exonukleaseaktivität besitzt, kommt es beim Ablesevorgang zu einer Zerstörung der TaqProbe[®] und damit zu einer räumlichen Trennung von Quencher und Reporter. Da nun kein Energietransfer mehr zwischen Quencher und Reporter stattfindet, kann jetzt auch der Reporter sein eigenes charakteristisches Licht

^f ermittelt mit der Software Primer Express[™] (Applied Biosystems)

emittieren. Die Intensität des gemessenen Reportersignals ist der Menge an PCR-Produkt direkt proportional. Wird anhand bekannter DNA- Konzentrationen eine Standardkurve erstellt, lässt sich später bei unbekannten DNA-Konzentrationen eine Quantifizierung durchführen.

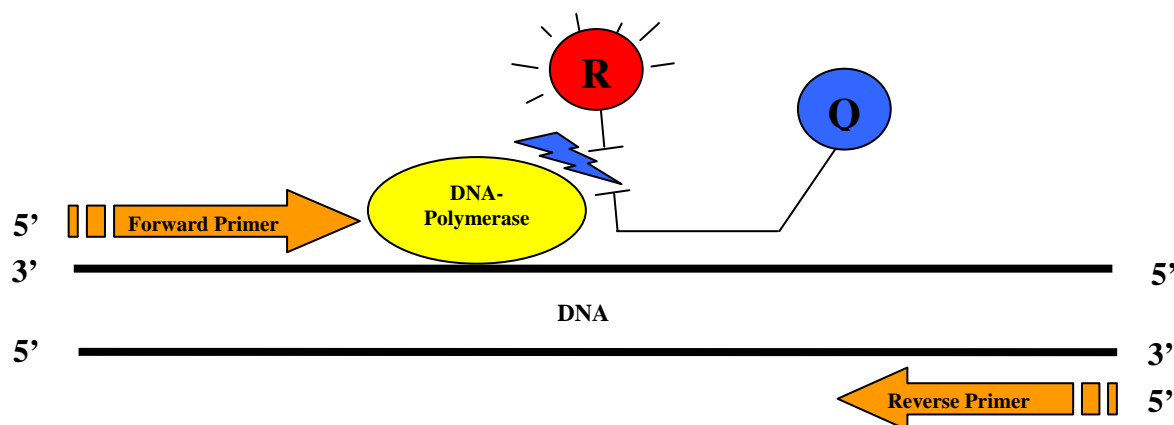


Abbildung 3-1: Prinzip des TaqMan® R=Reporter; Q=Quencher

In dieser Studie wurde als Reporterfarbstoff FAM und als Quencher TAMRA eingesetzt. Die passive Referenz, hier ROX (6-Carboxyrhodamin), war bereits im TaqMan® Universal PCR Master Mix enthalten.

3.2.4.2 Master Mix für die real-time PCR

Bestandteil	Volumina pro Reaktion	Endkonzentration
TaqMan® Universal PCR Master Mix (2x) (Applied Biosystems, Part Number 4304437)	25µl	1x
TaqProbe®	2,5µl	250 nM
Forward Primer [3,3µM]	4,5µl	300 nM
Reverse Primer [3,3µM]	4,5µl	300 nM
Aqua dest.	8,5µl	-
Template DNA	5,0µl	10-100 ng
Gesamtvolumen	50,0µl	-

Tabelle 3-7

3.2.4.3 Protokoll

Schritt	Zeit	Temperatur	
UNG-Aktivierung	2 min	50°C	
Aktivierung der AmpliTaq [®] Gold DNA-Polymerase	10 min	95°C	
Denaturierung	15 sec	95°C	} 40 Zyklen
Anlagerung / Polymerisierung	1 min	60°C	

Tabelle 3-8

3.2.4.4 Design von Primern und TaqProbe[®]

Die für das Primerdesign notwendigen genetischen Informationen, wurden über die *Entrez Nucleotides Database* von NCBI^g bezogen. Um die Unterschiede und Gemeinsamkeiten zwischen den einzelnen Spezies beurteilen zu können, wurden mit Hilfe der Online-Software Clustalw^h Multiple-Alignments generiert. Für die Genus-spezifische Differenzierung wurde derjenige Bereich gewählt, welcher die 16S rRNA codiert. Da die Möglichkeiten der speziesspezifischen Differenzierung innerhalb der 16S rRNA sehr begrenzt sind, sind wurde bei einigen Spezies auf andere Gene ausgewichen.

Primer-Set	Gen
Helicobacter spp.	16S rRNA (ribosomal RNA gene)
Helicobacter bilis	16S rRNA (ribosomal RNA gene)
Helicobacter hepaticus	cdtB (cytolethal distending toxin beta subunit gene)
Helicobacter muridarum	23S rRNA (ribosomal RNA gene)
Helicobacter cinaedi	rpoB (RNA polymerase beta subunit gene)
Helicobacter pylori	16S rRNA (ribosomal RNA gene)

Bei der Auswahl von Primern und TaqProbe[®] sind einige wichtige Kriterien von Bedeutungⁱ:

^g Homepage: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=Nucleotide>

^h Homepage: http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_clustalwan.html

ⁱ Empfehlungen der Firma Applied Biosystems (Perkin Elmer)

TaqProbe[®]

- das G/C-Verhältnis sollte im Bereich von 20-80% liegen
- Serien gleicher Nukleotide, insbesondere von Guanin, sollten vermieden werden
- am 5'-Ende sollte sich kein Guanin befinden
- die Schmelztemperatur sollte bei 65-68°C liegen
- dem Strang mit mehr Cytosin als Guanin ist Vorzug zu geben
- die Länge der TaqProbe[®] sollte zwischen 9-40 Basen liegen

Primer

- das G/C-Verhältnis sollte im Bereich von 20-80% liegen
- Serien gleicher Nukleotide, insbesondere von mehr als 4 Guanin, sollten vermieden werden
- die Schmelztemperatur sollte bei 58-60°C liegen
- die letzten 5 Nukleotide am 3'-Ende sollten nicht mehr als 2 Basen Guanin und/oder Cytosin aufweisen
- Forward- und Reverse-Primer sollten so nahe wie möglich an der TaqProbe[®] liegen, ohne diese jedoch zu überlappen

In Frage kommende Sequenzen wurden anhand der beschriebenen Kriterien ausgewählt und mit Hilfe der Software Primer Express[™] (Applied Biosystems) hinsichtlich des Schmelzpunktes und des G/C-Verhältnisses optimiert. Um den letztlich wichtigsten Aspekt, die Spezifität, beurteilen zu können, wurden anschließend sowohl die einzelnen Oligonukleotide, als auch das gesamte Amplikon mit der Online-Software NCBI Blast^j hinsichtlich einer zuverlässigen Differenzierung überprüft. Hierbei wurde darauf geachtet, dass in den Suchresultaten einerseits das Genus *Helicobacter*, bzw. die entsprechende Spezies, möglichst weit oben positioniert waren und andererseits die Wahrscheinlichkeit einer Interferenz mit anderen Spezies möglichst gering war. Um die Genus-Spezifität in der Praxis zu überprüfen, wurde die DNA von einigen, bei Mäusen vorkommenden, Darmerregern extrahiert und mit den ausgewählten Primerpaaren hinsichtlich einer möglichen Interferenz überprüft. Analog dazu wurden die speziesspezifischen Primerpaare überprüft, wobei zusätzlich auf mögliche Kreuzreaktionen mit anderen Vertretern des Genus *Helicobacter* geachtet wurde.

^j <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>

Erreger:	Escherichia coli
	Citrobacter rodentium
	Clostridium perfringens
	Campylobacter jejuni
	Pseudomonas aeruginosa
	Proteus mirabilis

Tabelle 3-9: Ausgewählte Infektionserreger zur Untersuchung auf Kreuzreaktivität

3.2.4.5 Primer- und TaqProbe®-Sequenzen

Bezeichnung	Richtung	Sequenz 5'-3'	Länge bp	% G/C	Tm ^k	Verwendung
HsppFP16s_407	Forward	5-GCC TAT GTC CTA TCA GCT TGT TGG-3	24	50,0%	60,0°C	Genus
HsppTaq16s_470	TaqProbe	5-CTG AGA GGG TGA TCG GAC ACA CTG GA-3	26	57,7%	68,3 °C	Genus
HsppRP16s_588	Reverse	5-CAA AAG GAG TTT ACA ATC CTA AAA CCT TC-3	29	34,5%	60,0°C	Genus
HbilisFP16s_290	Forward	5-CAA TTT GTG CGG AGA CTA GAC TTA GTG-3	27	44,4%	60,5°C	H. bilis
HbilisTaq16s_329	TaqProbe	5-CAA GCA AAT TGC GAA CTC ATC GAT TTA TCG-3	30	40,0%	68,9°C	H. bilis
HbilisRP16s_379	Reverse	5-ATC CTT TAG CGA AGG CTT TCA ATA AA-3	26	34,6%	60,6°C	H. bilis
HhepFPcdtB_360	Forward	5-GCA AAG AAC GAG GTA TTA AAC TTA ATT ATG TT-3	32	28,1%	59,9 °C	H. hepaticus
HhepTaq_cdtB_429	TaqProbe	5-GAA GTG AGT TTC CCC GAT GGA ACA AAG C-3	28	50,0%	68,8 °C	H. hepaticus
HhepRPcdtB_570	Reverse	5-CAT TAT CTT CAA TAG GAT TAT GAA TCG TAA CAA-3	33	27,3%	60,9 °C	H. hepaticus
HmurFP23s_65	Forward	5-CTT CAT TGC GGC GTA TGT CTA TAT-3	24	41,7%	58,3 °C	H. muridarum
HmurTaq23s_90	TaqProbe	5-CGC TTC ATT TGC AAT GAC CTC ACA ACC T-3	28	46,4%	69,2 °C	H. muridarum
HmurRP23s_120	Reverse	5-GGC GAA GTA TCT TGA GGT GAG TTT-3	24	45,8%	59,0 °C	H. muridarum
HcinFPprpB_24	Forward	5-ACA AAC GCC GAC TTT CCG-3	18	56,0%	58,0 °C	H. cinaedi
HcinTaqprpB_43	TaqProbe	5-ACT TGG TGA GGG TGG GCT TGT GAA AGA-3	27	52,0%	69,0 °C	H. cinaedi
HcinRPprpB_98	Reverse	5-GCA CAT CTC TTG CTT CAA AAC CTA C-3	25	44,0%	59,0 °C	H. cinaedi
HpylFP16s_995	Forward	5-AGT CTC TCC AGT AAT GCA GCT AAC GC-3	26	50,0%	62,2 °C	H. pylori
HpylTaq16s_1121	TaqProbe	5-ACA CGA AGA ACC TTA CCT AGG CTT GAC ATT GAG-3	33	45,5 %	68,2 °C	H. pylori
HpylRP16s_1179	Reverse	5-CCT GTT TTC AAG GTC TAG CAA GCT AGA-3	27	44,4%	61,4 °C	H. pylori

Tabelle 3-10: Übersicht über die Primer-Sequenzen

^k ermittelt mit der Software Primer Express™

3.2.4.6 Optimierung von Primern und TaqProbe®

Ziel einer solchen Optimierung ist die Bestimmung der minimalen Primer- bzw. Probe-Konzentration, welche in einer maximalen Signalstärke (ΔR_n) des Reporters resultiert.

Es wurden zunächst nur Forward- und Reverse Primer optimiert, wobei diese jeweils in unterschiedlichen Konzentrationen kombiniert wurden. Die TaqProbe® - Konzentration wurde initial mit 200nM eingesetzt und erst nach erfolgter Primeroptimierung angepasst. Um verlässliche Resultate zu erhalten wurde jede Kombination viermal überprüft.

Reverse Primer (nM)	Forward Primer (nM)		
	50	300	900
50	50/50	300/50	900/50
300	50/300	300/300	900/300
900	50/900	300/900	900/900

Tabelle 3-11: Schema für die Primeroptimierung

Für das weitere Vorgehen wurde diejenige Primer-Kombination ausgewählt, welche den geringsten Treshold-Zyklus aufwies. Unter Treshold-Zyklus (C_T) versteht man denjenigen Zyklus, bei dem erstmals ein signifikanter Anstieg des Reporter-Signals (ΔR_n) gemessen wird. Anschließend wurde die ausgewählte Primer-Kombination mit verschiedenen TaqProbe®-Konzentrationen kombiniert (25nM, 50nM, 75nM, 100nM, 125nM, 150nM, 175nM, 200nM, 225nM und 250nM) und jeweils viermal überprüft. Die so erhaltenen Primer-TaqProbe®-Konzentrationen wurden für alle Assays ermittelt und später zur Diagnostik eingesetzt.

Nach erfolgter Optimierung zeigten sich 300nM für die Primer und 225nM für die TaqProbe® als optimale Konzentrationen für alle in dieser Studie entwickelten real-time PCR-Assays.

3.2.4.7 Herstellung einer Primer-Stocklösung

Herstellung einer Stocklösung mit 100µM:

Falls die Stoffmenge nicht vom Hersteller angegeben wurde, konnte über den folgenden Rechenweg die Stoffmenge bestimmt werden:

Angaben z.B.: Molekulargewicht = 8836,6 g/mol

Masse der Primer = 330,8 µg

Umrechnung der Einheiten:

$$8836,6 \text{ g/mol} = 8,8366 \cdot 10^{-6} \text{ g/nmol} = 8,8366 \text{ µg/nmol}$$

$$100 \text{ µM} = 100 \text{ µmol/l}$$

Berechnung der Stoffmenge:

$$\frac{330,8 \text{ µg}}{8,8366 \frac{\text{µg}}{\text{nmol}}} = 37,4 \text{ nmol}$$

Berechnung der Menge an RNase freiem Wasser um eine 100µM Stock zu erhalten:

$$\frac{0,0374 \text{ µmol}}{x} = \frac{100 \text{ µmol}}{1000000 \text{ µl}}$$

$$x = \frac{0,0374 \text{ µmol}}{0,0001 \frac{\text{µmol}}{\text{µl}}} = 374 \text{ µl}$$

In diesem Beispiel wurden 374µl H₂O benötigt, um eine Stock-Konzentration von 100µM zu erhalten.

3.2.4.8 Herstellung verschiedener Verdünnungen

Die zur Primer- und TaqProbe®-Optimierung benötigten Konzentration, wurden mit dem nachfolgenden Rechenweg ermittelt. Zu beachten ist, dass erst im entsprechenden Reaktionsvolumen von 50µl die errechneten Konzentrationen erreicht werden.

Um den Pipettierfehler möglichst gering zu halten, wurden weitere 3 verschiedene Verdünnungslösungen, ausgehend von einem 100µM Stock, hergestellt. Dies gewährleistete ein genügend großes Pipettivolumen. Der 100µM Stock wurde für die Konzentration 900nM 1:10 (=10µM), für die Konzentration 300nM 1:20 (=5µM) und für die Konzentration 50nM 1:40 (=2,5µM) verdünnt.

Nachfolgender Rechenweg zeigt, welche Menge den jeweiligen Verdünnungen entnommen werden mussten, um in 50µl Reaktionsvolumen die entsprechenden Konzentrationen zu erreichen.

Für 900nM ergibt sich:	Für 300nM ergibt sich:	Für 50nM ergibt sich:
$\frac{10\mu\text{mol}}{1000000\mu\text{l}} \cdot x = \frac{0,9\mu\text{mol}}{1000000\mu\text{l}} \cdot 50\mu\text{l}$ $x \cdot 0,00001 \frac{\mu\text{mol}}{\mu\text{l}} = 0,000045\mu\text{mol}$ $x = \frac{0,000045\mu\text{mol}}{0,00001 \frac{\mu\text{mol}}{\mu\text{l}}} = 4,5\mu\text{l}$	$\frac{5\mu\text{mol}}{1000000\mu\text{l}} \cdot x = \frac{0,3\mu\text{mol}}{1000000\mu\text{l}} \cdot 50\mu\text{l}$ $x \cdot 0,000005 \frac{\mu\text{mol}}{\mu\text{l}} = 0,000015\mu\text{mol}$ $x = \frac{0,000015\mu\text{mol}}{0,000005 \frac{\mu\text{mol}}{\mu\text{l}}} = 3,0\mu\text{l}$	$\frac{2,5\mu\text{mol}}{1000000\mu\text{l}} \cdot x = \frac{0,05\mu\text{mol}}{1000000\mu\text{l}} \cdot 50\mu\text{l}$ $x \cdot 0,0000025 \frac{\mu\text{mol}}{\mu\text{l}} = 2,5 \cdot 10^{-6} \mu\text{mol}$ $x = \frac{2,5 \cdot 10^{-6} \mu\text{mol}}{0,0000025 \frac{\mu\text{mol}}{\mu\text{l}}} = 1,0\mu\text{l}$

Tabelle 3-12

Stock-Konzentration	zu entnehmende Menge	Endkonzentration in 50µl
10µM	4,5µl	900nM
5µM	3,0µl	300nM
2,5µM	1,0µl	50nM

Tabelle 3-13: Übersicht über die Primer-Konzentrationen

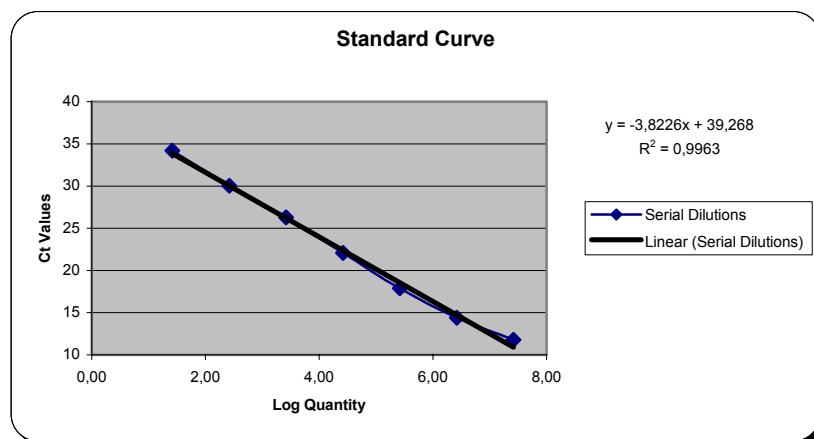
Analog wurde der TaqProbe[®]-Stock (100nM) 1:20 auf 5nM verdünnt. Die zu entnehmenden Volumina wurden wie vorstehend beschrieben errechnet.

Stock-Konzentration	zu entnehmende Menge	Endkonzentration in 50µl
5µM	0,25µl	25nM
	0,50µl	50nM
	0,75µl	75nM
	1,00µl	100nM
	1,25µl	125nM
	1,50µl	150nM
	1,75µl	175nM
	2,00µl	200nM
	2,25µl	225nM
	2,50µl	250nM

Tabelle 3-14: Übersicht über die TaqProbe[®]-Konzentrationen

3.2.4.9 Erstellung einer Standardkurve

Die Quantifizierung unbekannter DNA-Ausgangsmengen beruht auf ermittelten C_T-Werten von Standards bekannter Konzentrationen. In dieser Studie wurden Helicobacter-DNA-Extrakte mit Hilfe des GeneQuant[®] (Pharmacia Biotech) oder NanoDrop[®] hinsichtlich ihres DNA-Gehalts spektrophotometrisch untersucht und anschließend Verdünnungsreihen hergestellt.



Die mit diesen Verdünnungsreihen generierten Daten wurden mittels der ABI Prism[®] 7700 Software SDS 9.1 (Applied Biosystems) analysiert und in eine Tabellenkalkulationssoftware (Microsoft[®] Excel 2000) exportiert. Um verlässliche Daten zu erhalten, wurden jeweils die Mittelwerte aus 5 Läufen

berechnet und diese als Basis für weitere Berechnungen herangezogen. In der Tabellenkalkulation wurden die auf Grundlage der DNA-Konzentrationen errechneten *Helicobacter*-Genome logarithmisch konvertiert und auf der Y-Achse gegen die verschiedenen Treshold-Zyklen (X-Achse) aufgetragen.

Die Berechnung der *Helicobacter*-Genome bei gegebener DNA-Dichte erfolgte auf folgender Grundlage:

Als Genomgröße diente die von SUERBAUM (Suerbaum et al., 2003) gefundene Chromosomenlänge von 1.799.146 Basenpaaren für *Helicobacter hepaticus*. Da das Molekulargewicht für 1 Basenpaar ca. 650g/mol entspricht, entsprechen 1.799.146 Basenpaare etwa $1,1694 \times 10^9$ g/mol. Teilt man die Avogadro'sche Zahl (6.0×10^{23} Moleküle/mol) durch das Molekulargewicht des Genoms ($1,1694 \times 10^9$ g/mol), so erhält man die Anzahl der Genome in 1g DNA ($= 5,1306 \times 10^{14}$ Genome/g DNA). Da die DNA-Konzentrationen der Verdünnungsreihen bekannt sind, läßt sich die Genomzahl für jede Konzentration einfach bestimmen.

Beispiel: die Konzentration einer Verdünnung beträgt 10,2µg/ml DNA

Für die PCR wurden nur 5µl der Verdünnung eingesetzt, also 0,051µg DNA. Da sich in 1g DNA $5,1306 \times 10^{14}$ Genome befinden, entsprechen 0,051µg etwa $2,6166 \times 10^7$ Genomen von *Helicobacter hepaticus*.

Um nach einer PCR einen ausgegebenen C_T -Wert quantitativ interpretieren zu können, sucht man auf der Y-Achse den entsprechenden C_T -Wert und fährt waagerecht die X-Achse entlang, bis zu dem Punkt an dem die Standardkurve geschnitten wird. Von dort fährt man senkrecht auf die X-Achse und liest den korrespondierenden Log-Wert ab. Setzt man diesen gefundenen Wert als Exponenten zur Basis 10 ein, so erhält man näherungsweise die Anzahl an *Helicobacter* Genomen für einen gegebenen C_T -Wert.

3.2.5 Serologischer Nachweis mit ELISA

Der ELISA (Enzym-linked-immunosorbent-assay) gehört den sehr sensitiven, serologischen Nachweisverfahren. Man unterscheidet zwischen einem direkten und indirekten ELISA. Für diese Arbeit wurde der indirekte ELISA eingesetzt (siehe auch Kapitel 4.4.2). Hierbei werden von *Helicobacter*-Spezies gewonnene Antigene (Zellwandproteine) auf einer Mikrotiterplatte an eine Festphase gebunden. Anschließend wird das zu untersuchende Serum hinzugegeben und die

entstandenen Antigen-Antikörper-Komplexe über eine nachfolgende Farbreaktion mittels Enzymen sichtbar gemacht. Die Extinktionsänderung ist der Antikörperkonzentration der Probe direkt proportional. Die folgende Abbildung gibt den schematischen Ablauf wieder.

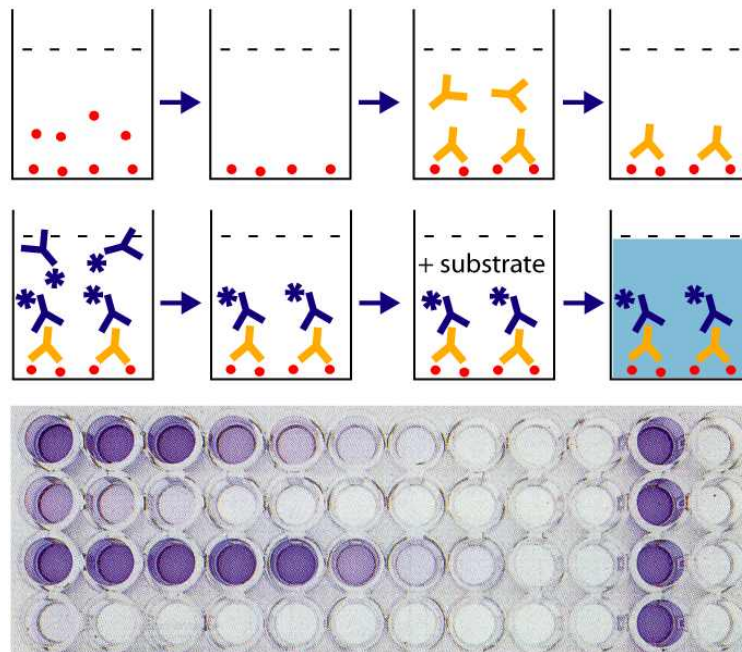


Abbildung 3-2

3.2.6 Versuch 1: Erregerpathogenität und minimale infektiöse Dosis

3.2.6.1 Versuchsaufbau

Ziel dieses Versuches war die Klärung, wie hoch die minimale infektiöse Dosis der einzelnen Erreger ist, ob die Infektion histopathologisch nachweisbar ist und ob hierbei speziesspezifische Unterschiede zu erwarten sind. Dazu wurden von den Erregern *H. hepaticus*, *H. bilis* und *H. muridarum*, jeweils *Helicobacter*-Suspensionen mit 10^4 , 10^6 und 10^8 Keimen pro 0,5 Milliliter hergestellt und den Tieren mittels einer Knopfkanüle in den Magen instilliert. Die Versuchsdauer betrug 42 Tage. Es wurden insgesamt 27 SCID-Mäuse infiziert und 3 SCID-Mäuse als Negativkontrolle eingesetzt. Jede Infektionsgruppe (insgesamt 9 und 1 Kontrollgruppe) bestand aus 3 Tieren, welche jeweils zusammen in einem IVC-Käfig gehalten wurden. Es wurden für die Histopathologie 8 und für die real-time PCR 7 Probenahmestellen definiert.

Eine Übersicht über den Versuchsaufbau gibt die nachfolgende Tabelle.

Helicobacter spp.	Anzahl Mäuse	Infektionsdosis	Versuchsdauer	Probenahmestellen
H. bilis	3	10^8 Keime pro ml	42 Tage	Magen – Pars proventricularis Magen – Fundus Magen – Pylorus Duodenum –medial Jejunum – proximal Caecum – Zäkumspitze Colon – proximal Colon – distal
H. bilis	3	10^6 Keime pro ml	42 Tage	
H. bilis	3	10^4 Keime pro ml	42 Tage	
H. hepaticus	3	10^8 Keime pro ml	42 Tage	
H. hepaticus	3	10^6 Keime pro ml	42 Tage	
H. hepaticus	3	10^4 Keime pro ml	42 Tage	
H. muridarum	3	10^8 Keime pro ml	42 Tage	
H. muridarum	3	10^6 Keime pro ml	42 Tage	
H. muridarum	3	10^4 Keime pro ml	42 Tage	
Kontroll-Mäuse	3	Ø	42 Tage	

Tabelle 3-15: Versuchsaufbau und Probenahmestellen für die Histopathologie (Versuch 1)

Um auch Infektionen erfassen können welche keine nachweisbaren Veränderungen zeigen, wurden die entsprechenden Organabschnitte zusätzlich mittels real-time PCR auf *Helicobacter* untersucht.

Helicobacter spp.	Anzahl Mäuse ¹	Infektionsdosis	Versuchsdauer	Probenahmestellen
H. bilis	3	10 ⁸ Keime pro ml	42 Tage	Leber (Lobus caudatus) Magen – Fundus Jejunum – medial Ileum – medial Caecum – Zäkumspitze Colon – proximal Fäzes – Rektum
H. bilis	3	10 ⁶ Keime pro ml	42 Tage	
H. bilis	3	10 ⁴ Keime pro ml	42 Tage	
H. hepaticus	3	10 ⁸ Keime pro ml	42 Tage	
H. hepaticus	3	10 ⁶ Keime pro ml	42 Tage	
H. hepaticus	3	10 ⁴ Keime pro ml	42 Tage	
H. muridarum	3	10 ⁸ Keime pro ml	42 Tage	
H. muridarum	3	10 ⁶ Keime pro ml	42 Tage	
H. muridarum	3	10 ⁴ Keime pro ml	42 Tage	
Kontroll-Mäuse	3	Ø	42 Tage	

Tabelle 3-16: Probenahmestellen für die real-time PCR

3.2.6.2 Herstellung des Inokulates und experimentelle Infektion

Für die Infektion wurden 3-4 Tage alte Kulturen von *H. hepaticus*, *H. bilis* und *H. muridarum* ausgewählt. Durch eine mikroskopische und biochemische Untersuchung, sowie einer darauffolgenden PCR, wurde die Identität der Keime sichergestellt. Für die Herstellung der Suspension hat sich folgende Methode als effizient erwiesen: Pro Petrischale werden, je nach Feuchtigkeit des Mediums, etwa 1-3ml PBS mit einer sterilen Pipette auf den Agar pipettiert. Anschließend wird mit einem sterilen Drigalski-Spatel die Flüssigkeit die gesamte Agar-Oberfläche ausgestrichen und so die Kolonien mit der Flüssigkeit vermischt. Wird die Petrischale nun leicht geneigt, kann mit einer Pipette eine hochkonzentrierte Bakteriensuspension abgeschöpft werden.

¹ Tiere stammen aus Tabelle 3-15

Die konzentrierte Suspension wurde dann durch Zugabe definierter Mengen an PBS auf die entsprechenden Bakterienkonzentrationen eingestellt. Hierzu wurde zunächst mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer die Bakterienkonzentration durch Auszählen bestimmt. Anschließend wurde errechnet, wieviel PBS dem Konzentrat zugefügt werden musste, um die Suspensionen auf 10^4 , 10^6 und 10^8 Keime pro 0,5ml einzustellen. Nach erfolgter Verdünnung wurden die hergestellten Suspensionen erneut mit der Neubauer Zählkammer überprüft.

Die zu infizierenden Mäuse wurden unter einer Sterilbank mit einer Knopfkanüle mit jeweils 0,5ml der Bakteriensuspension oral infiziert.

3.2.6.3 Probenentnahme für die Histopathologie und die real-time PCR

Nach 42 Tagen erfolgte die Euthanasie durch CO₂. Nach einer adspektorischen Untersuchung wurden die Tiere durch einen Medianschnitt entlang der Linea alba eröffnet. Anschließend wurde das Magen-Darmkonvolut, einschließlich der Leber, unter sterilen Kautelen exenteriert. Es wurden für die Untersuchungen folgende Proben in cranio-caudaler Richtung entnommen:

<u>Histopathologie :</u>	<u>real-time PCR:</u>
Ø	Leber (Lobus caudatus)
Magen – Pars proventricularis	Ø
Magen – Fundus	Magen – Fundus
Magen – Pylorus	Ø
Duodenum – medial	Ø
Jejunum – proximal	Ø
Ø	Jejunum – medial
Ø	Ileum – medial
Caecum – Zäkumspitze	Caecum – Zäkumspitze
Colon – proximal	Ø
Colon – distal	Colon – distal
Ø	Fäzes – Rektum

Tabelle 3-17

Die Proben für die Histopathologie wurden in Formalin (10%) fixiert und vom Pathologischen Institut der Veterinärmedizinischen Fakultät Zürich, untersucht. Die PCR-Proben wurden unbehandelt kurzfristig bei -20°C gelagert und alsbald die DNA-Extraktion durchgeführt.

3.2.7 Versuch 2: Zeitlicher Verlauf der Infektion

3.2.7.1 Versuchsaufbau

Während im vorangegangenen Versuch 1 die minimale infektiöse Dosis, sowie die histopathologische Nachweisbarkeit der *Helicobacter* spp. untersucht wurden, stand in diesem Versuch der zeitliche Verlauf der Infektion im Vordergrund.

Es wurde pro *Helicobacter*-Spezies eine Infektionsdosis von 10^8 Keimen eingesetzt. Jeweils 3 Tiere wurden an den Tagen 2, 4, 7, 14 und 40 post infectionem euthanasiert und mittels real-time PCR untersucht. Zusätzlich wurden den 3er Gruppen Tag 7, 14 und 40 jeweils 2 SCID- und 2 NMRI-Mäuse zugesetzt und ebenfalls untersucht. Diese Tiere wurden nicht infiziert und sollten als Sentinel-Tiere Aufschluss über die Übertragbarkeit der Infektion geben. Hierbei wurde untersucht, inwieweit immundefiziente SCID-Mäuse und immunkompetente NMRI-Mäuse unterschiedlich auf den Infektionsdruck reagieren. Um die immunologischen Auswirkungen der *Helicobacter*-Exposition beurteilen zu können, wurden jeweils vor Versuchsbeginn und vor der Sektion Blutproben gewonnen und Serum hergestellt.

Untersuchungstag post infectionem	<i>Helicobacter</i> spp.	infizierte Maus	Sentinels
2	<i>H. bilis</i>	3 SCID	Ø
4	<i>H. bilis</i>	3 SCID	Ø
7	<i>H. bilis</i>	3 SCID	2 SCID & 2 NMRI
14	<i>H. bilis</i>	3 SCID	2 SCID & 2 NMRI
40	<i>H. bilis</i>	3 SCID	2 SCID & 2 NMRI
2	<i>H. hepaticus</i>	3 SCID	Ø
4	<i>H. hepaticus</i>	3 SCID	Ø
7	<i>H. hepaticus</i>	3 SCID	2 SCID & 2 NMRI
14	<i>H. hepaticus</i>	3 SCID	2 SCID & 2 NMRI
40	<i>H. hepaticus</i>	3 SCID	2 SCID & 2 NMRI
2	<i>H. muridarum</i>	3 SCID	Ø
4	<i>H. muridarum</i>	3 SCID	Ø
7	<i>H. muridarum</i>	3 SCID	2 SCID & 2 NMRI
14	<i>H. muridarum</i>	3 SCID	2 SCID & 2 NMRI
40	<i>H. muridarum</i>	3 SCID	2 SCID & 2 NMRI

Tabelle 3-18: Übersicht über den Versuchsaufbau

3.2.7.2 Probenentnahme für die real-time PCR

Die Euthanasie und Probenentnahme erfolgte dem Versuch 1 entsprechend. Im Gegensatz zu Versuch 1 wurden hier ausschließlich Proben für die real-time PCR, sowie Blut für die Serologie entnommen.

real-time PCR:

Leber (Lobus caudatus)

Magen – Fundus

Duodenum – medial

Jejunum – medial

Ileum – medial

Caecum – Zäkumspitze

Colon – distal

Fäzes – Rektum

Tabelle 3-19

4 Resultate

4.1 Konventionelle PCR

4.1.1 Genus-spezifische PCR

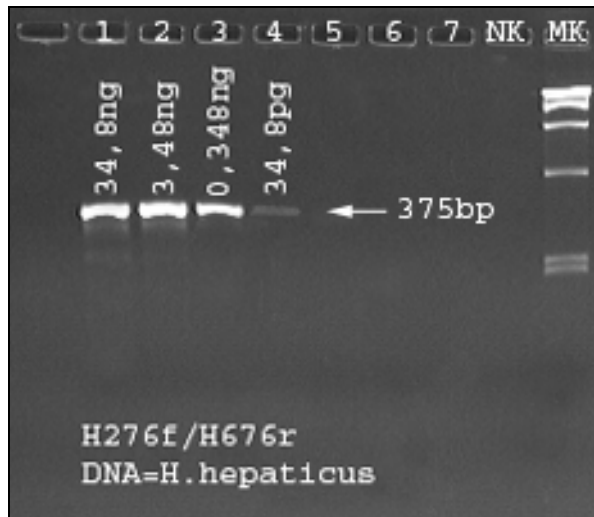


Abbildung 4-1

Um die Sensitivität einer bereits etablierten, Genus-spezifischen PCR mit der neu entwickelten real-time PCR vergleichen zu können, wurde ein Assay von RILEY ET AL. eingesetzt. Die gefundene Nachweisgrenze in ihrer Arbeit betrug 5pg (Riley et al., 1996). In dieser Arbeit war 34,8pg die letzte nachweisbare serielle Verdünnung.

4.1.2 Spezies-spezifische PCR

4.1.2.1 *Helicobacter hepaticus*

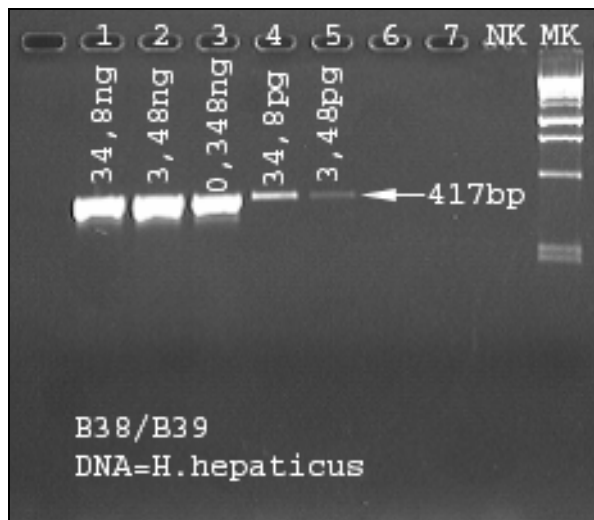


Abbildung 4-2

Das von SHAMES ET AL. publizierte Protokoll gibt bei Verwenden der Taq-Polymerase eine Nachweisgrenze von 50-10ng an (Shames et al., 1995). Die letzte nachweisbare serielle Verdünnungsstufe betrug in unserem Versuch 3,4pg.

4.1.2.2 *Helicobacter bilis*

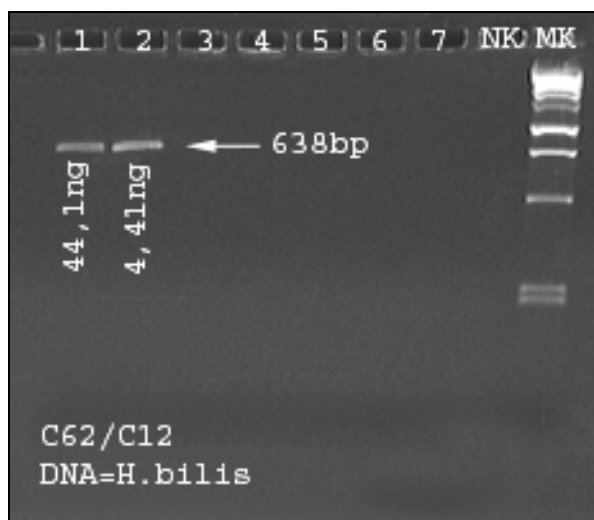


Abbildung 4-3

Das von FOX ET AL. publizierte Protokoll zeigte in dieser Studie eine Nachweisgrenze von 4,41ng (Fox et al., 1995).

4.2 Real-time PCR

Die hier vorgestellten real-time PCR Assays haben sich insgesamt als sehr sensitiv und spezifisch gezeigt. Einzig bei der Genus-spezifischen real-time PCR konnte in einigen seltenen Fällen ab ca. Zyklus 39 auch in *No Template Controls* (NTC) ein positiver C_T -Wert beobachtet werden. Es konnte hierbei keine Kontamination von PCR-Reagenzien oder der NTC's nachgewiesen werden. Es sind Fälle berichtet worden, in den es auch in *No Template Controls* aufgrund von Primer-Dimeren oder Primer-Probe-Dimeren zu einem positiven C_T -Wert kommen kann^m. Die hier vorgestellten Primer wurden alle auf mögliche komplementäre Sequenzen hin untersucht. Es konnten keine einander komplementären Bereiche gefunden werden. Um trotzdem mögliche Einflüsse auf die real-time PCR zu berücksichtigen, wurde ein Grenzwert von 0,2 *Helicobacter*/ng DNA definiert. Erst ab diesem Wert ist ein Ergebnis als positiv interpretiert worden.

4.2.1 Genus-spezifische real-time PCR

Standardkurve

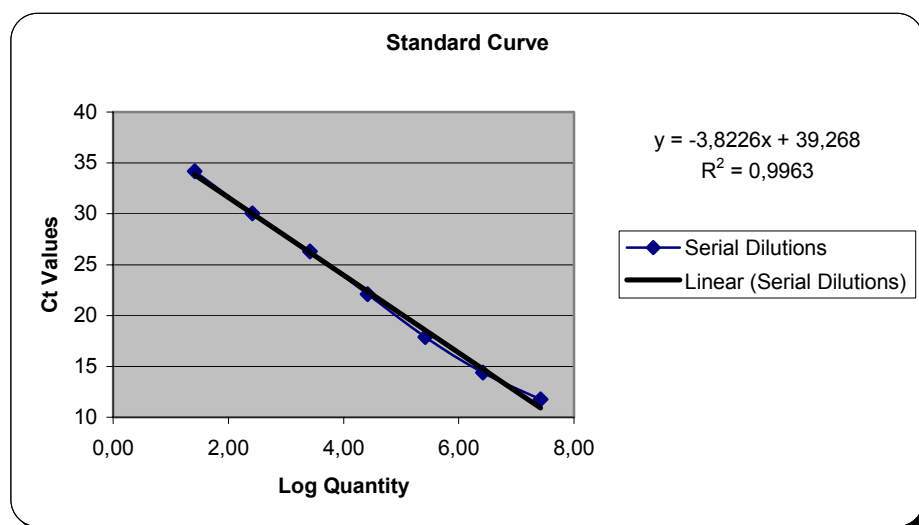


Abbildung 4-4

^m Taq Man Direct Probes Assay Protocol: ABI Prism® (Applied Biosystems)

Sensitivität

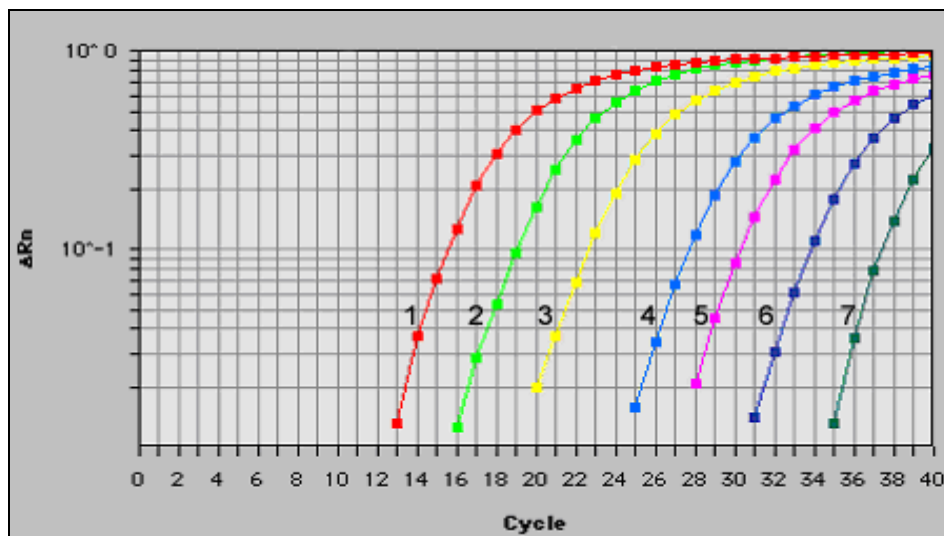


Abbildung 4-5: DNA=*H. hepaticus*; Die Kurven entsprechen folgenden DNA-Mengen pro Reaktion: 1=51ng; 2=5,1ng; 3=510pg; 4=51pg; 5=5,1pg; 6=510fg; 7=51fg

Verglichen mit der beschriebenen konventionellen PCR (Abbildung 4-1), ist dieses Protokoll etwa 680 mal sensitiver.

Spezifität

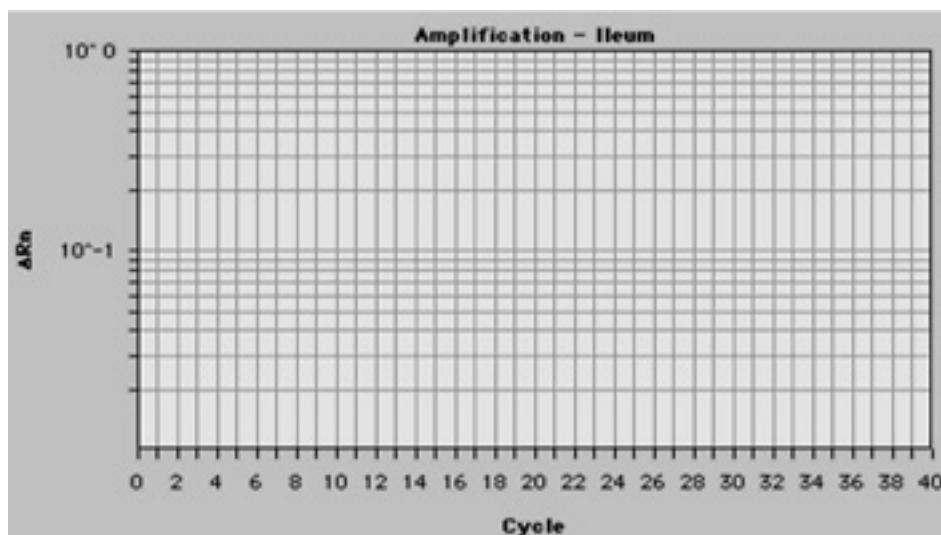


Abbildung 4-6

Ergebnis des Spezifitäts-Tests: keine Amplifikation von *E. coli*, *Citrobacter rodentium*, *Clostridium perfringens*, *Campylobacter jejuni*, *Pseudomonas aeruginosa* und *Proteus mirabilis*.

4.2.2 Spezies-spezifische real-time PCR

4.2.2.1 Helicobacter hepaticus

Standardkurve

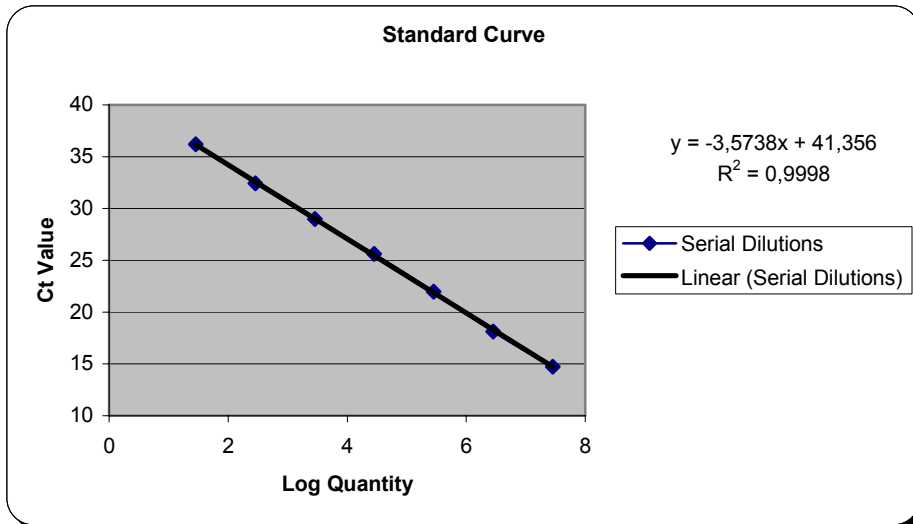


Abbildung 4-7

Sensitivität

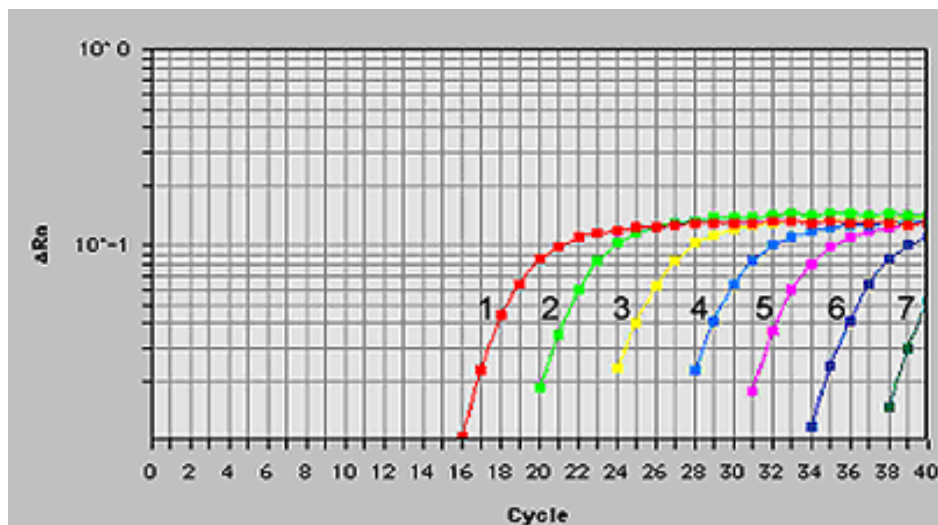


Abbildung 4-8: DNA=H. hepaticus. Die Kurven entsprechen folgenden DNA-Mengen pro Reaktion: 1=55,5ng; 2=5,55ng; 3=555pg; 4=55,5pg; 5=5,55pg; 6=555fg; 7=55,5fg

Verglichen mit der beschriebenen konventionellen PCR (Abbildung 4-2), ist dieses Protokoll etwa 60 mal sensitiver.

Spezifität

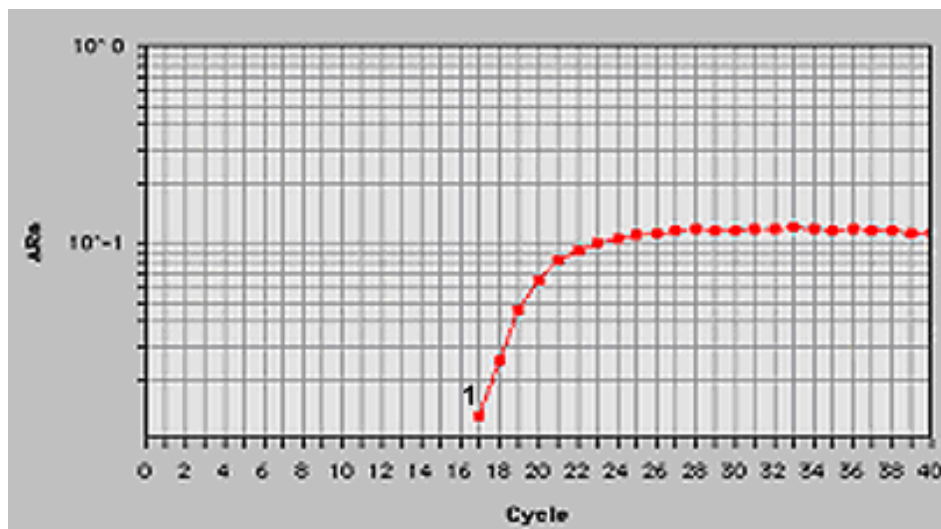


Abbildung 4-9: DNA 1=H. hepaticus

DNA von H. bilis, H. muridarum, H. cinaedi, H. cholecystus und H. pylori wurde nicht amplifiziert.

4.2.2.2 Helicobacter bilis

Standardkurve

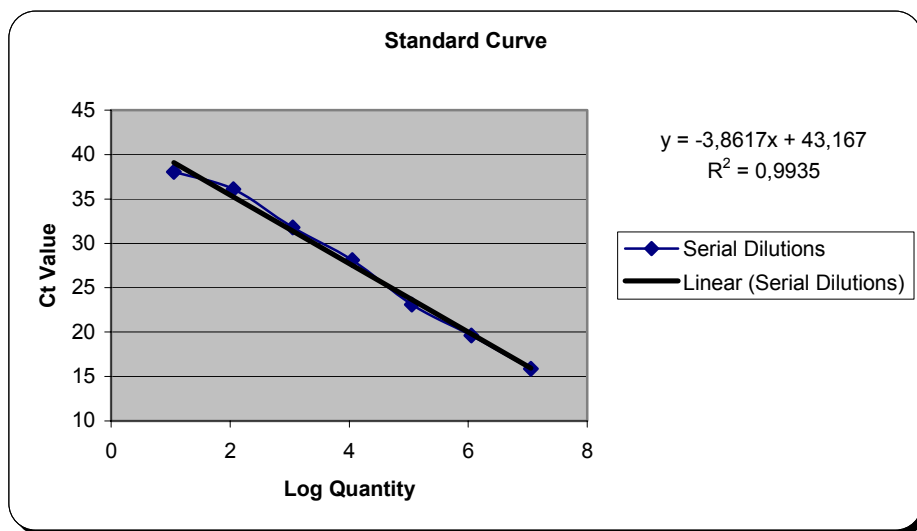


Abbildung 4-10

Sensitivität

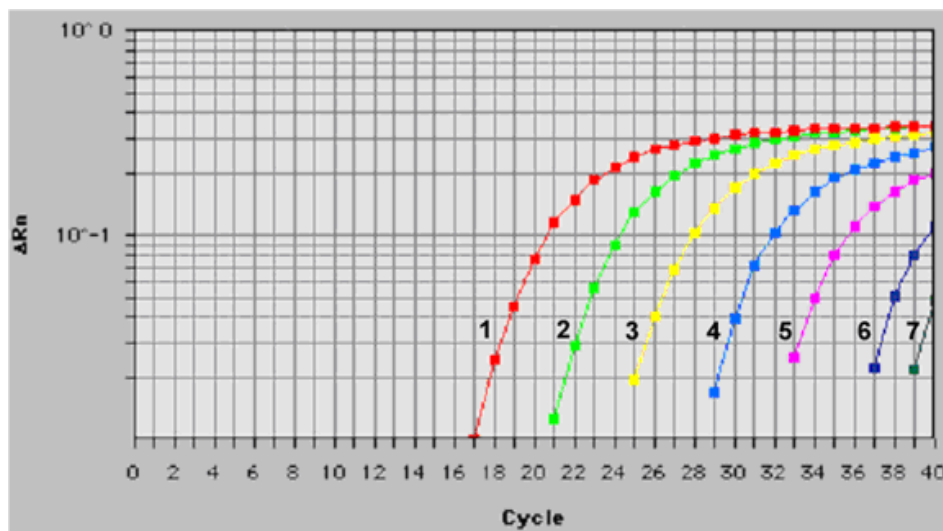


Abbildung 4-11: DNA=H. bilis. Die Kurven entsprechen folgenden DNA-Mengen pro Reaktion: 1=22,0ng; 2=2,2ng; 3=220pg; 4=22,0pg; 5=2,2pg; 6=220fg; 7=22,0fg

Verglichen mit der beschriebenen konventionellen PCR (Abbildung 4-3), ist dieses Protokoll etwa 200.000 mal sensitiver.

Spezifität

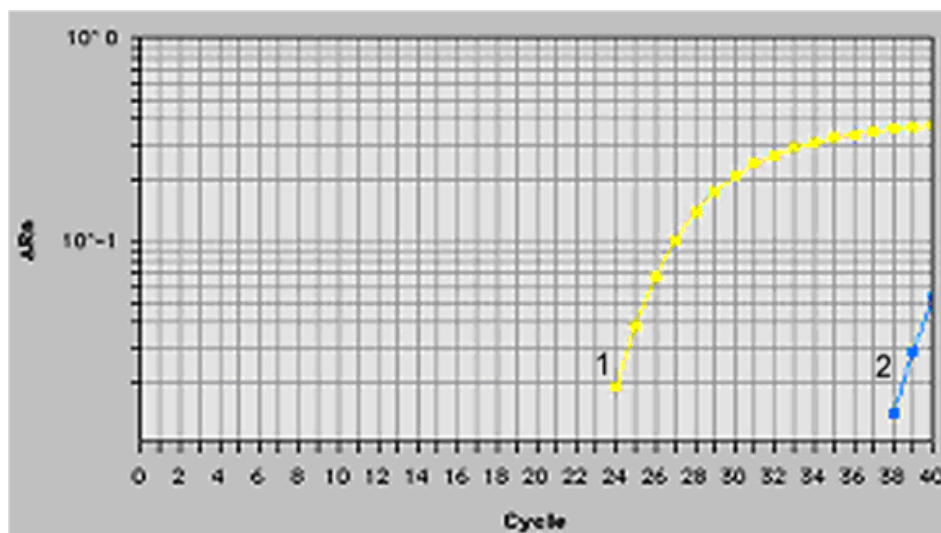


Abbildung 4-12: DNA 1=H. bilis, DNA 2=H. hepaticus

DNA von *H. muridarum*, *H. cinaedi*, *H. cholecystus* und *H. pylori* wurde nicht amplifiziert. *H. hepaticus* wurde geringfügig amplifiziert.

4.2.2.3 *Helicobacter muridarum*

Standardkurve

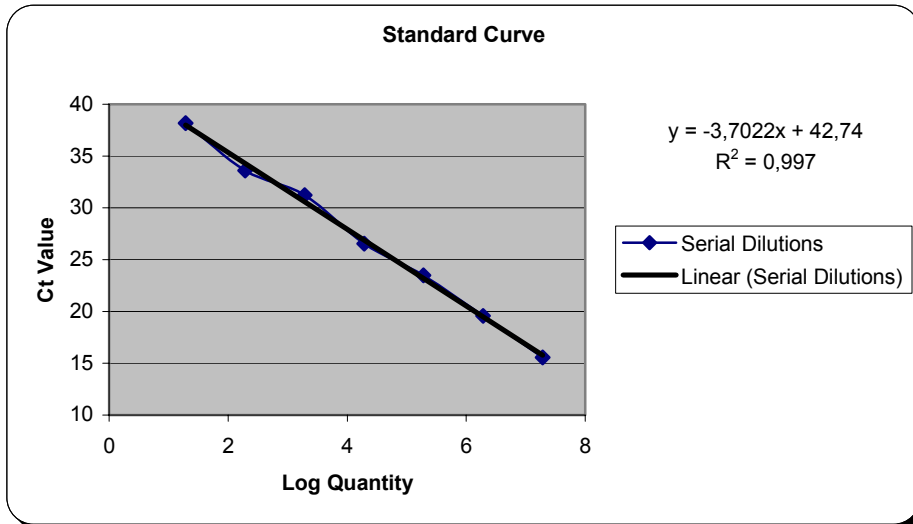


Abbildung 4-13

Sensitivität

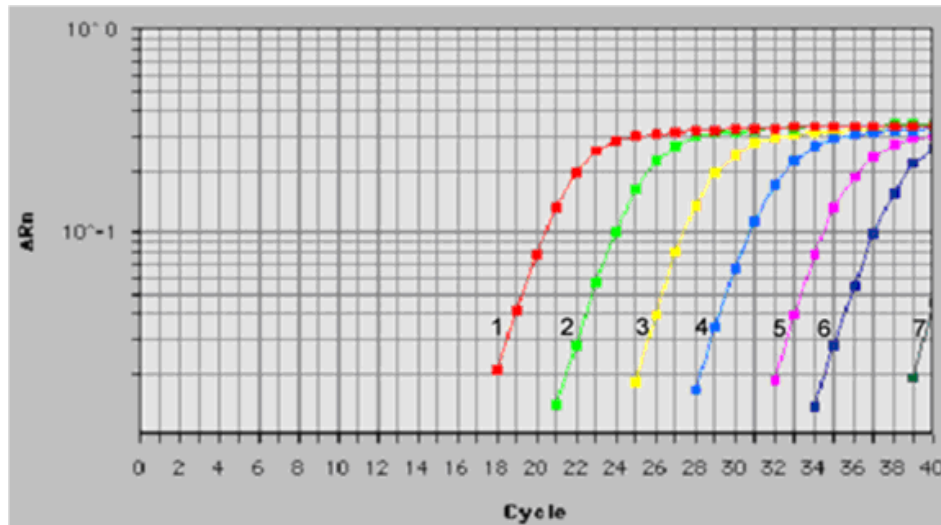


Abbildung 4-14: DNA=*H. muridarum*. Die Kurven entsprechen folgenden DNA-Mengen pro Reaktion: 1=37,5ng; 2=3,75ng; 3=375pg; 4=37,5pg; 5=3,75pg; 6=375fg; 7=37,5fg

Die Nachweisgrenze lag bei 37,5fg DNA.

Spezifität

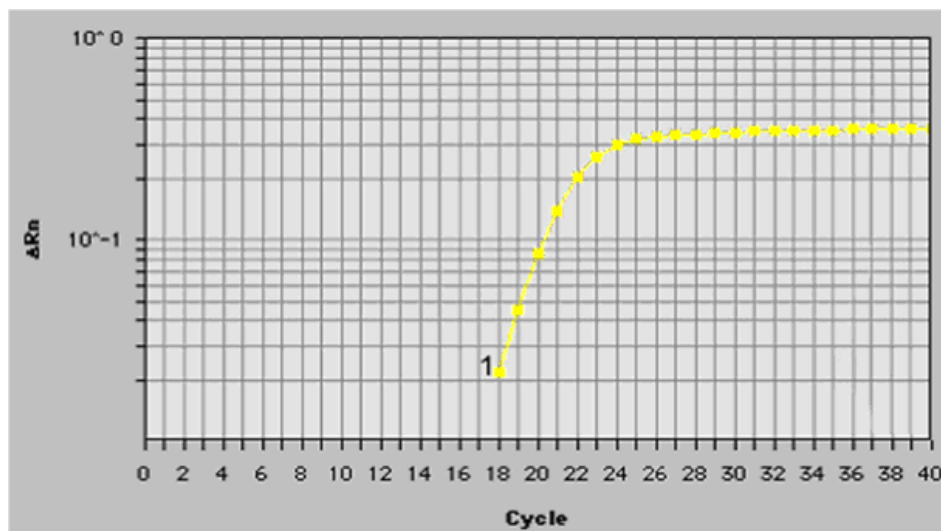


Abbildung 4-15: DNA 1=*H.muridarum*

DNA von *H. bilis*, *H. hepaticus*, *H. cinaedi*, *H. cholecystus* und *H. pylori* wurde nicht amplifiziert.

4.2.2.4 *Helicobacter cinaedi*

Standardkurve

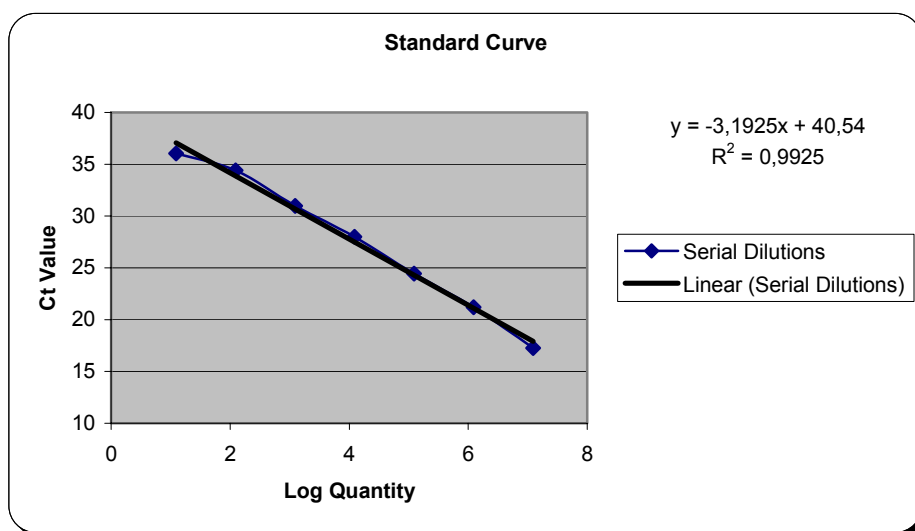


Abbildung 4-16

Sensitivität

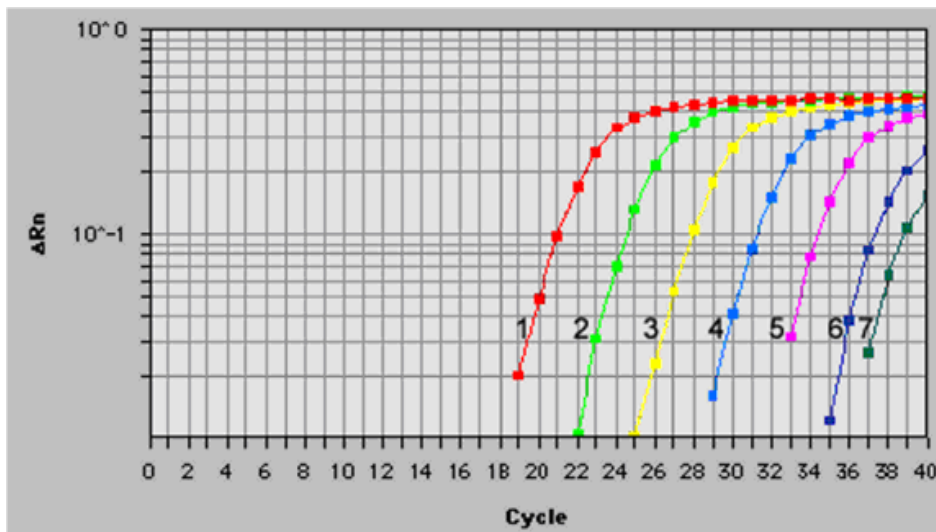


Abbildung 4-17: DNA=*H. cinaedi*. Die Kurven entsprechen folgenden DNA-Mengen pro Reaktion: 1=24,0ng; 2=2,40ng; 3=240pg; 4=24,0pg; 5=2,40pg; 6=240fg; 7=24,0fg

Die Nachweisgrenze lag bei 24,0fg DNA.

Spezifität

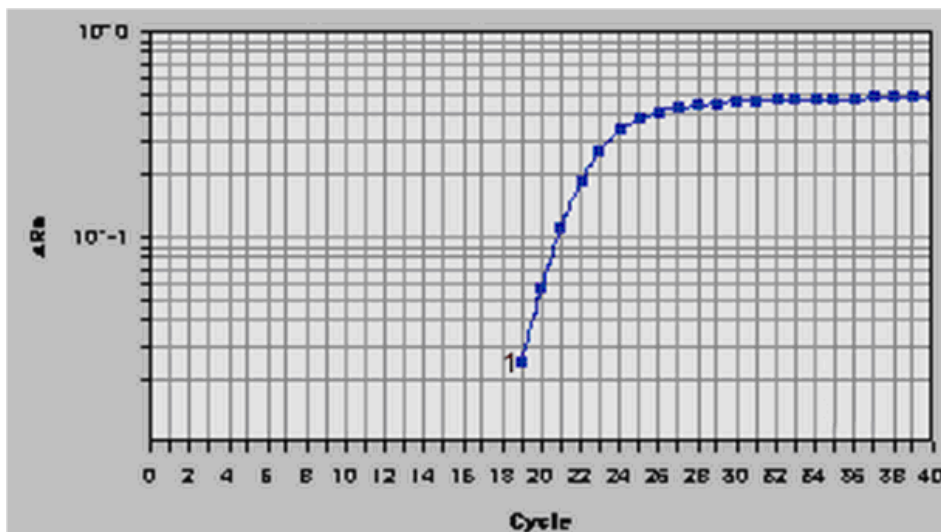


Abbildung 4-18: DNA 1=*H. cinaedi*

DNA von *H. bilis*, *H. hepaticus*, *H. muridarum*, *H. cholecystus* und *H. pylori* wurde nicht amplifiziert.

4.2.2.5 Helicobacter pylori

Standardkurve

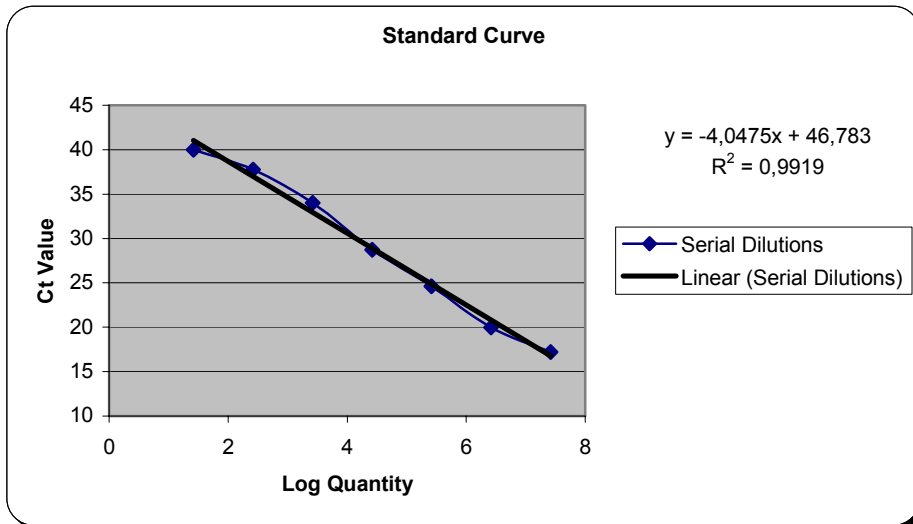


Abbildung 4-19

Sensitivität

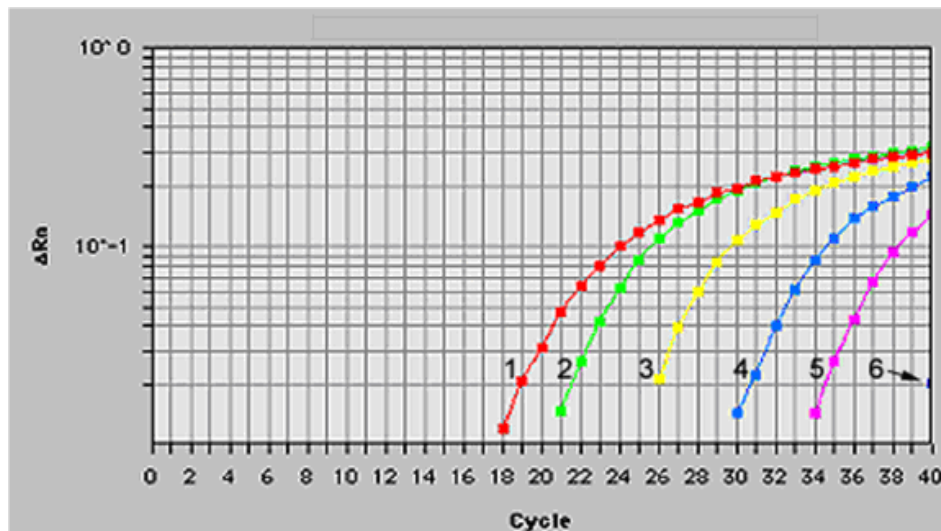


Abbildung 4-20: DNA=*H. pylori*. Die Kurven entsprechen folgenden DNA-Mengen pro Reaktion: 1= 51ng; 2=5,1ng; 3=510pg; 4=51pg; 5=5,1pg; 6=510fg

Die Nachweisgrenze lag bei 510fg DNA. Das von BOHR ET AL. publizierte Protokoll gibt eine Nachweisgrenze von 100fg an (Bohr et al., 2002). Ihr Protokoll ist demnach etwa 5 mal sensitiver als die hier vorgestellte real-time PCR.

Spezifität

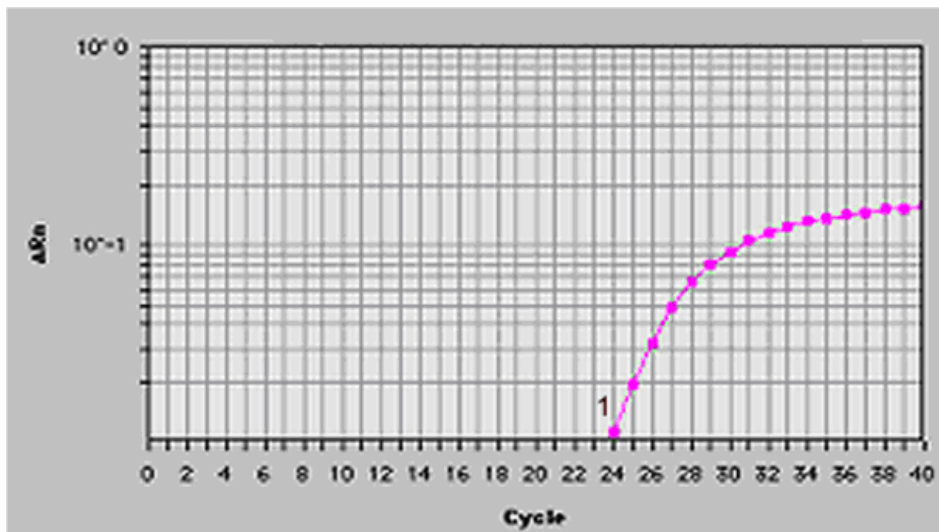


Abbildung 4-21: DNA 1=*H. pylori*

DNA von *H. bilis*, *H. hepaticus*, *H. muridarum*, *H. cholecystus* und *H. cinaedi* wurde nicht amplifiziert.

4.3 Versuch 1: Erregerpathogenität und minimale infektiöse Dosis

4.3.1 Ergebnisse der real-time PCR nach 42 Tagen nach Inokulation

Um eine anschauliche graphische Darstellung zu gewährleisten, wurde aufgrund der geringen Probezahlen und den teilweise hohen Schwankungen der gemessenen Keimzahlen (siehe Rohdaten im Anhang), der Medianwert ausgewählt. Die einzelnen Abbildungen wurden so aufgebaut, dass die anatomische Zuordnung der Ergebnisse nach Organabschnitten leicht möglich ist.

Da die in den Versuchen entnommenen Gewebeproben sich hinsichtlich ihres Gewichts geringfügig unterscheiden, ist prinzipbedingt kein direkter Vergleich zwischen zwei Gewebeproben und den darin ermittelten *Helicobacter*-Mengen möglich. Aus diesem Grunde wurde zur Normierung jeweils die DNA-Dichte ermittelt. Da sich die unterschiedlichen Gewebe in Bezug auf ihren DNA-Gehalt nur geringfügig voneinander unterscheiden, kann die Bestimmung der genomischen DNA-Dichte als Maß für die Gewebemenge aufgefasst werden. Setzt man nun die ermittelten *Helicobacter*-Mengen und DNA-Dichten in Beziehung zueinander, so erhält man die normierten *Helicobacter*-Mengen pro Gewichtseinheit DNA (ng).

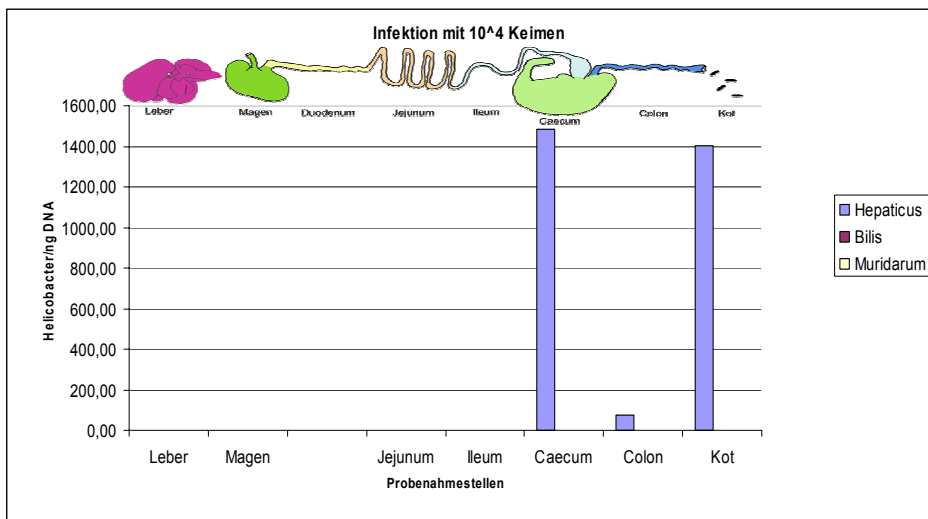


Abbildung 4-22: Infektionsdosis = 10^4 *Helicobacter*; Infektionsdauer = 42 Tage
(angegeben sind die Medianwerte)

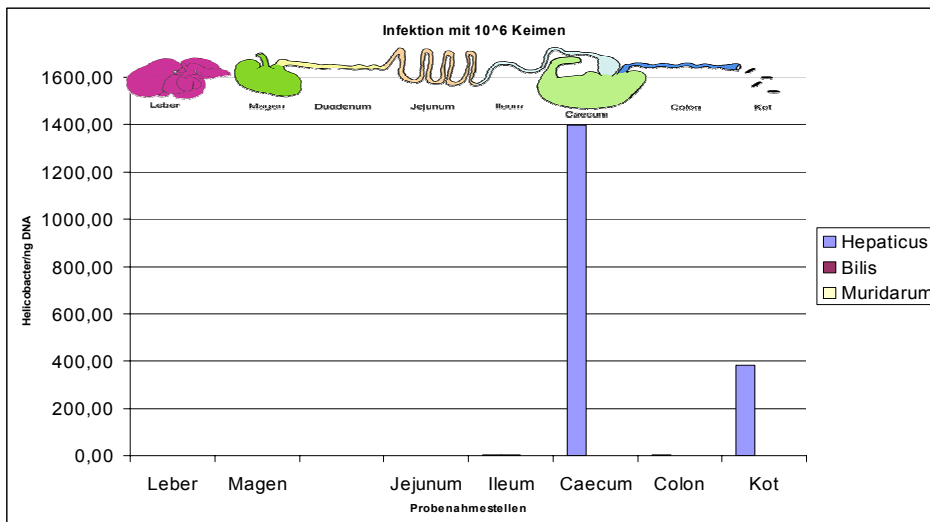


Abbildung 4-23: Infektionsdosis = 10^6 *Helicobacter*; Infektionsdauer = 42 Tage
(angegeben sind die Medianwerte)

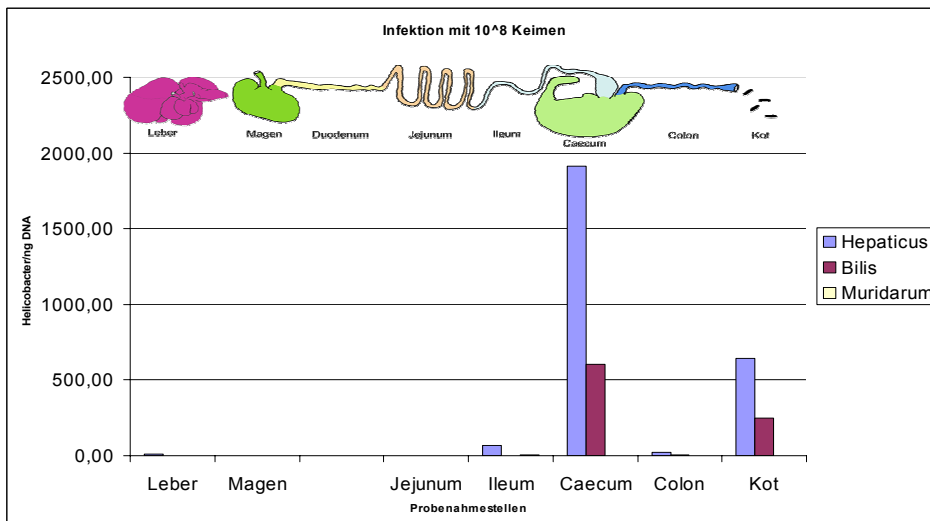


Abbildung 4-24: Infektionsdosis = 10^8 *Helicobacter*; Infektionsdauer = 42 Tage
(angegeben sind die Medianwerte)

4.3.2 Ergebnisse der Histopathologie nach 42 Tagen

Spezies	Infektionsdosis	Histopath. Befunde Magen, Pars proventricularis (HE)	Histopath. Befunde Magen, Pars proventricularis (Gie-C)	Histopath. Befunde Magen, Pars proventricularis (W&S)	Histopath. Befunde Magen, Fundus (HE)	Histopath. Befunde Magen, Fundus (Gie-C)	Histopath. Befunde Magen, Fundus (W&S)	Histopath. Befunde Magen, Pylorus (HE)
H. hep.	10 ⁸ /ml	0	0	0	0	0	0	0
H. hep.	10 ⁶ /ml	0	0	0	0	0	0	0
H. hep.	10 ⁴ /ml	0	0	0	0	0	0	0
H. bilis	10 ⁸ /ml	0	0	+/-	0	0	0	0
H. bilis	10 ⁶ /ml	0	0	0	0	0	0	0
H. bilis	10 ⁴ /ml	0	0	0	0	0	0	0
H. mur.	10 ⁸ /ml	0	0	0	0	0	0	0
H. mur.	10 ⁶ /ml	0	0	0	0	0	0	0
H. mur.	10 ⁴ /ml	0	0	0	0	0	0	0
Kontrollen	-	0	0	0	0	0	0	0

Spezies	Infektionsdosis	Histopath. Befunde Magen, Pylorus (Gie-C)	Histopath. Befunde Magen, Pylorus (W&S)	Histopath. Befunde Duodenum (HE)	Histopath. Befunde Duodenum (Gie-C)	Histopath. Befunde Duodenum (W&S)	Histopath. Befunde Jejunum prox. (HE)	Histopath. Befunde Jejunum prox. (Gie-C)
H. hep.	10 ⁸ /ml	0	0	0	0	0	0	0
H. hep.	10 ⁶ /ml	0	0	0	0	0	0	0
H. hep.	10 ⁴ /ml	0	0	0	0	0	0	0
H. bilis	10 ⁸ /ml	0	0	0	0	0	0	0
H. bilis	10 ⁶ /ml	0	0	0	0	0	0	0
H. bilis	10 ⁴ /ml	0	0	0	0	0	0	0
H. mur.	10 ⁸ /ml	+++	0	0	0	0	0	0
H. mur.	10 ⁶ /ml	0	0	0	0	0	0	0
H. mur.	10 ⁴ /ml	0	0	0	0	0	0	0
Kontrollen	-	0	0	0	0	0	0	0

Spezies	Infektionsdosis	Histopath. Befunde Jejunum prox. (W&S)	Histopath. Befunde Caecum (HE)	Histopath. Befunde Caecum (W&S)	Histopath. Befunde Colon prox. (HE)	Histopath. Befunde Colon prox. (W&S)	Histopath. Befunde Colon dist. (HE)	Histopath. Befunde Colon dist. (W&S)
H. hep.	10 ⁸ /ml	0	0	++	0	0	0	0
H. hep.	10 ⁶ /ml	0	0	+	0	0	0	0
H. hep.	10 ⁴ /ml	0	0	0	0	0	0	0
H. bilis	10 ⁸ /ml	0	0	+/-	0	0	0	0
H. bilis	10 ⁶ /ml	0	0	0	0	0	0	0
H. bilis	10 ⁴ /ml	0	0	+	0	0	0	0
H. mur.	10 ⁸ /ml	0	0	0	0	0	0	0
H. mur.	10 ⁶ /ml	0	0	0	0	0	0	0
H. mur.	10 ⁴ /ml	0	0	0	0	0	0	0
Kontrollen	-	0	0	0	0	0	0	0

Tabelle 4-1: Übersicht über die histopathologischen Untersuchungen mit unterschiedlichen Färbeverfahren. 0 = keine Helicobacter nachweisbar; + = einzelne, wenige Helicobacter diffus verteilt; ++ = Helicobacter in kleineren Gruppen; +++ = größere Anzahl von Helicobacter mit schwarmförmiger Ausbreitung; HE = Haematoxin-Eosin Färbung, W&S = Färbung nach Warthin-Starry, Giemsa-C = Färbung nach Giemsa

4.4 Versuch 2: Zeitlicher Verlauf der Infektion mit 10^8 Erregern

4.4.1 Ergebnisse der real-time PCR

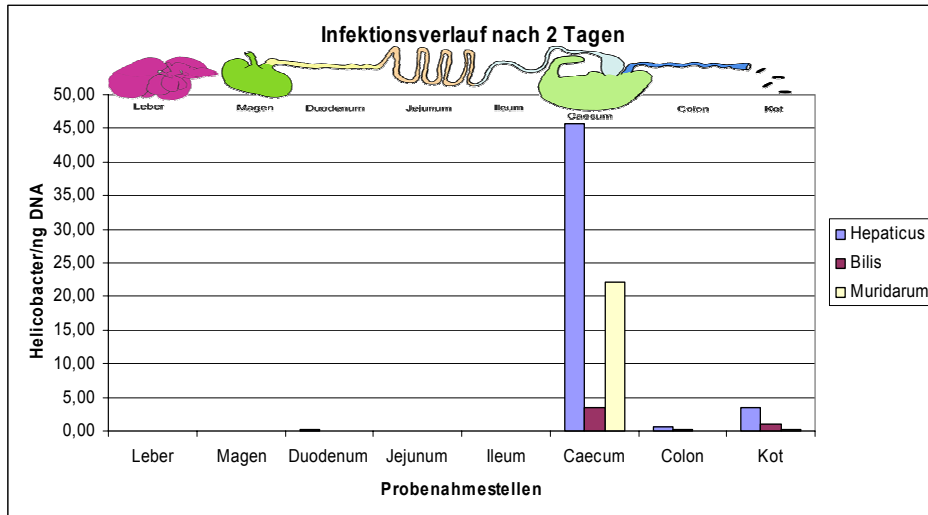


Abbildung 4-25: Infektionsdauer = 2 Tage (angegeben sind die Medianwerte)

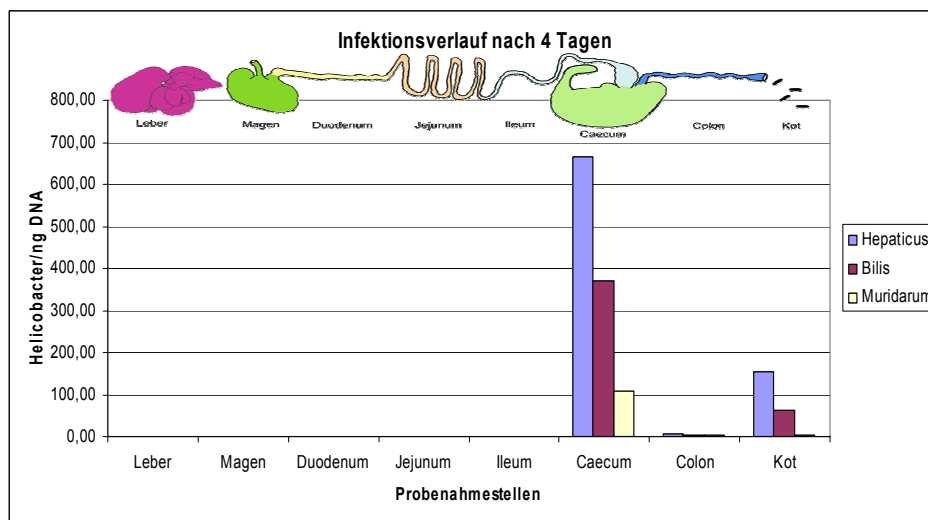


Abbildung 4-26: Infektionsdauer = 4 Tage (angegeben sind die Medianwerte)

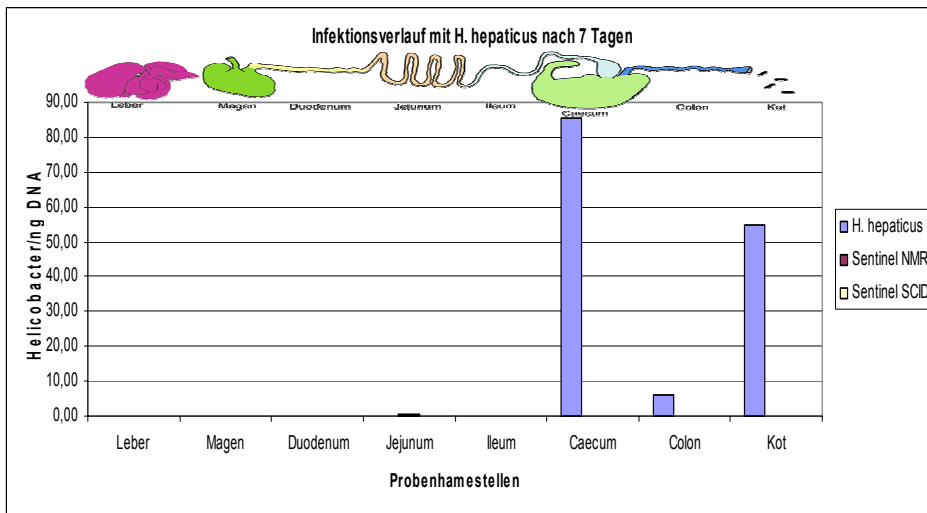


Abbildung 4-27: Infektionsdauer = 7 Tage (angegeben sind die Medianwerte)

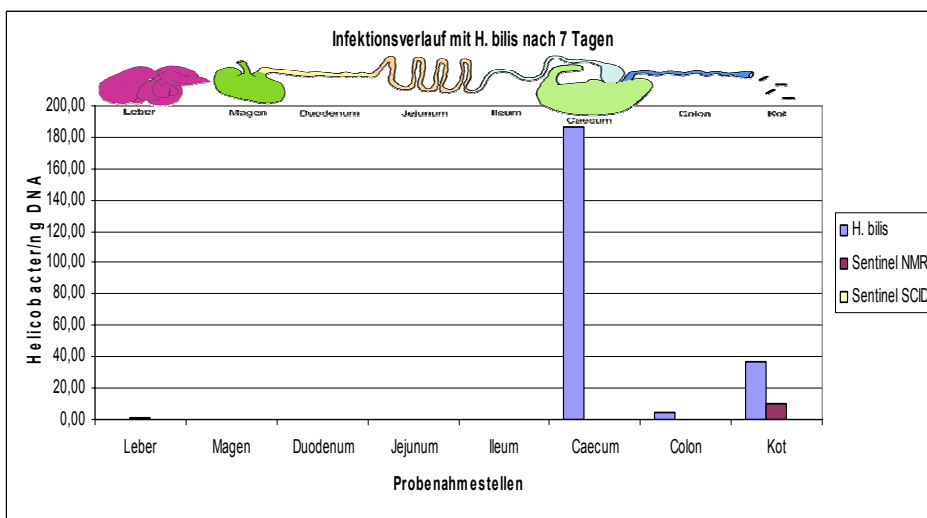


Abbildung 4-28: Infektionsdauer = 7 Tage (angegeben sind die Medianwerte)

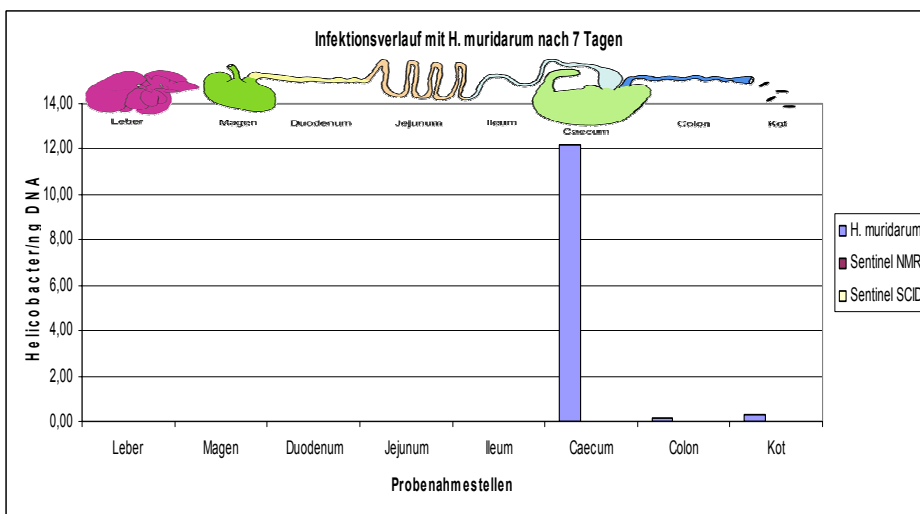


Abbildung 4-29: Infektionsdauer = 7 Tage (angegeben sind die Medianwerte)

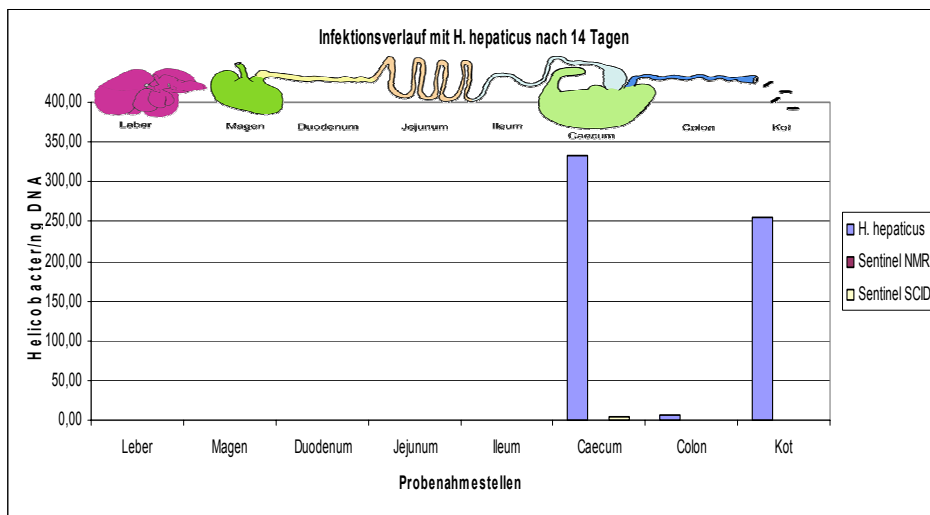


Abbildung 4-30: Infektionsdauer = 14 Tage (angegeben sind die Medianwerte)

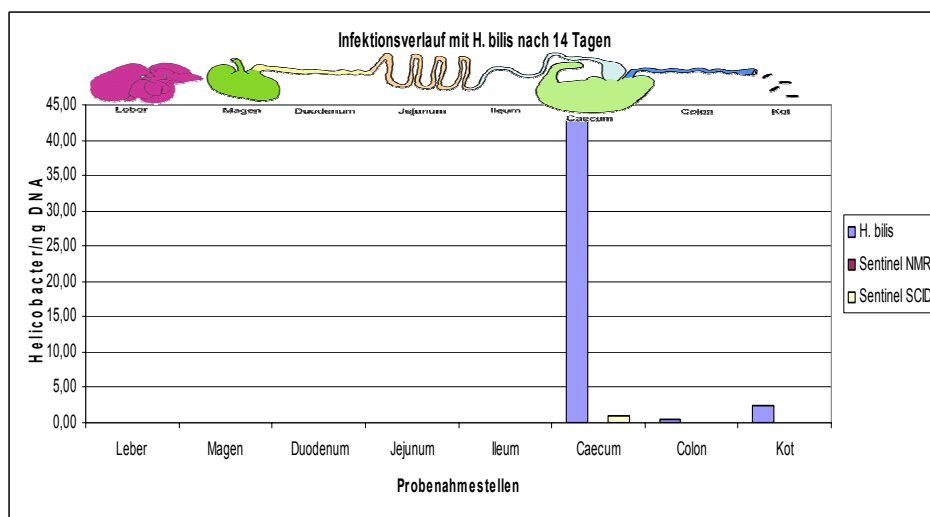


Abbildung 4-31: Infektionsdauer = 14 Tage (angegeben sind die Medianwerte)

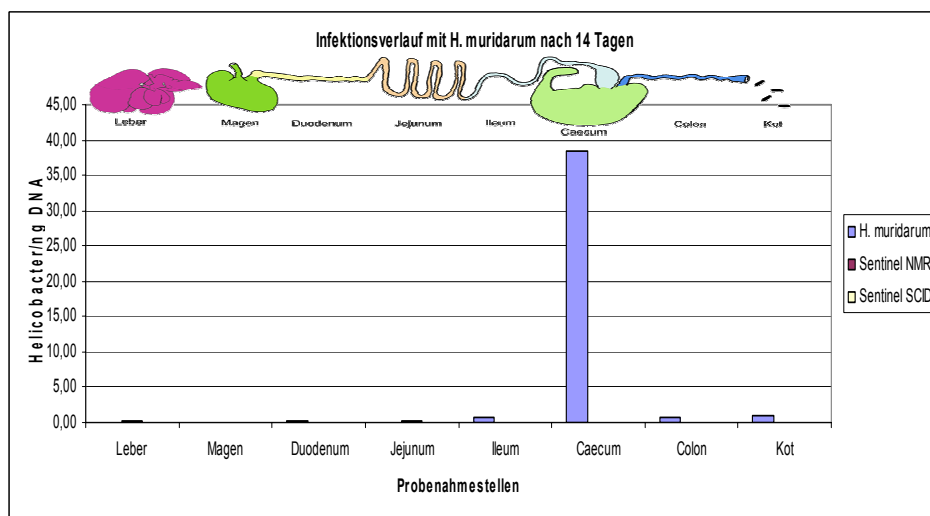


Abbildung 4-32: Infektionsdauer = 14 Tage (angegeben sind die Medianwerte)

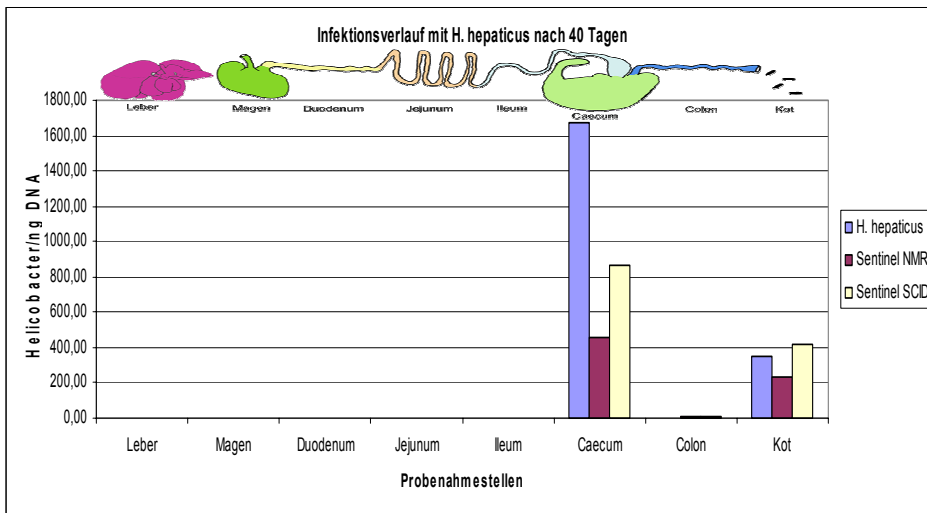


Abbildung 4-33: Infektionsdauer = 40 Tage (angegeben sind die Medianwerte)

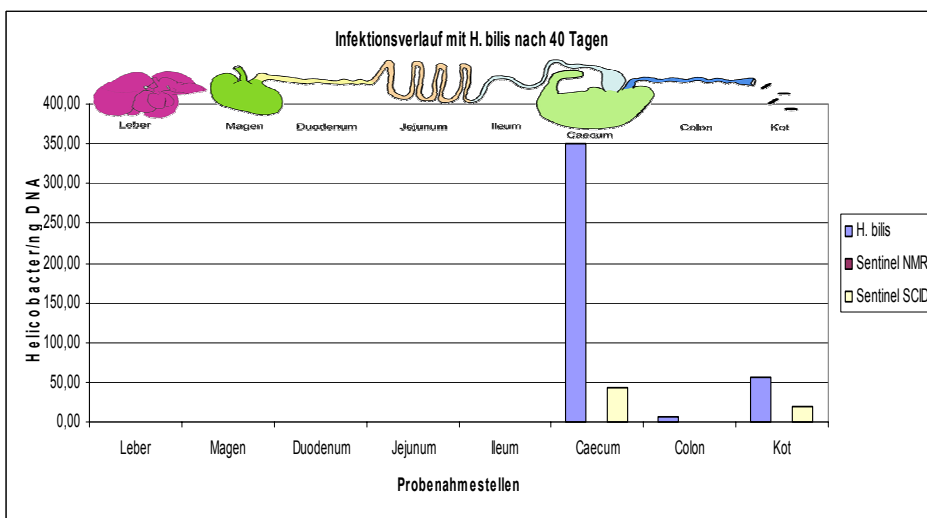


Abbildung 4-34: Infektionsdauer = 40 Tage (angegeben sind die Medianwerte)

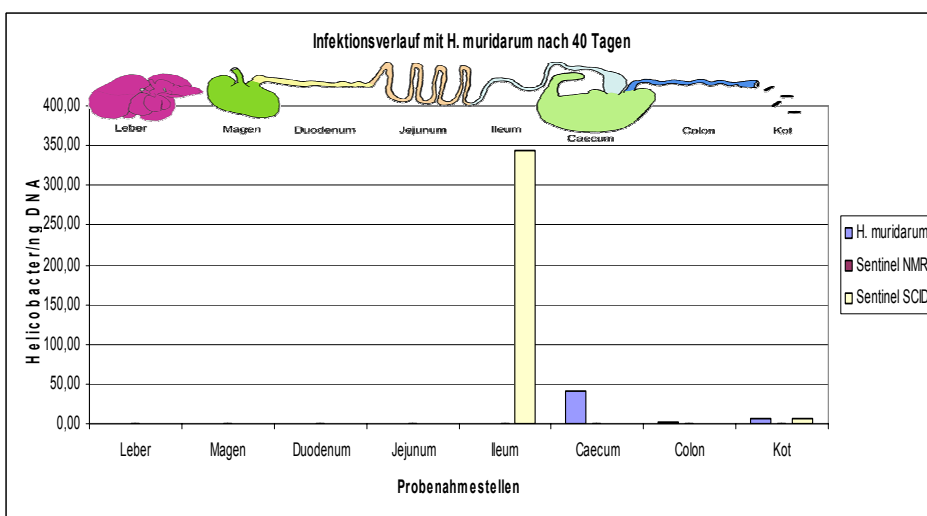


Abbildung 4-35: Infektionsdauer = 40 Tage (angegeben sind die Medianwerte)

4.4.2 Ergebnisse der Serologie der Sentinels

Die serologischen Untersuchungen (ELISA) wurden am Laboratory Animal Microbiology Lab. for Infectious Disease Screening, National Institute of Public Health, 3720 BA Bilthoven NL durchgeführt. Das Protokoll basiert auf einer Publikation von Ron Boot (Boot et al., 1993), welches ursprünglich für *Streptobacillus moniliformis* entwickelt und später an *H. hepaticus*, *H. bilis* und *H. muridarum* adaptiert wurde. Die Werte entsprechen OD's, welche als Prozentwert zu den OD's der Positivkontrollen angegeben wurden.

Spezies	Sentinel	Präserum			Postserum		
		Tag 7	Tag 14	Tag 40	Tag 7	Tag 14	Tag 40
H. bilis	NMRI Nr.1	5	7	6	6	9	9
	NMRI Nr.2	7	4	6	5	5	9
	SCID Nr. 1	2	1	2	2	2	2
	SCID Nr. 2	2	1	2	1	2	3
H. hepaticus	NMRI Nr.1	12	15	15	7	14	54
	NMRI Nr.2	17	10	12	14	15	37
	SCID Nr. 1	0	0	0	0	0	0
	SCID Nr. 2	0	0	0	0	0	0
H. muridarum	NMRI Nr.1	0	3	3	1	4	13
	NMRI Nr.2	6	4	1	5	6	5
	SCID Nr. 1	0	0	0	0	0	0
	SCID Nr. 2	0	0	0	0	0	0

Tabelle 4-2

5 Diskussion

Ziele dieser Arbeit waren die Entwicklung sensitiver und spezifischer real-time PCR Assays auf Genus- und Spezies-Ebene, sowie der Vergleich dieser Methode mit der konventionellen PCR, dem ELISA und einer histopathologischen Untersuchung. Weitere Aspekte waren die Evaluierung geeigneter Probenahmestellen, sowie die Klärung, ob die DNA-Extraktion aus Kot geeignet ist, um den Infektionsstatus eines Tieres zuverlässig wiederzuspiegeln.

5.1 *Vergleich der konventionellen PCR mit der real-time PCR*

Um einen Vergleich zwischen der konventionellen PCR und der real-time PCR anstellen zu können, wurden Assays herangezogen, welche bereits in der täglichen Laborpraxis etabliert sind. Das von RILEY ET AL. entwickelte Genus-spezifische *Helicobacter*-Protokoll wurde mit einer Nachweisgrenze von 5pg angegeben (Riley et al., 1996). Dies konnte in dieser Arbeit nicht bestätigt werden, da wir wenigstens 34,8pg nachweisen konnten. Die hier vorgestellte Genus-spezifische real-time PCR ist mit einer Nachweisgrenze von 51fg (entspricht etwa 26 *Helicobacter* Genomen) somit etwa 680 mal sensitiver als die konventionelle PCR in diesem Vergleich (Abbildung 4-1) und etwa 100 mal sensitiver als von RILEY angegeben. Im Vergleich mit anderen beschriebenen real-time PCR Assays sind die Unterschiede eher geringfügig. DRAZENOVICH ET AL. gaben in ihrer Arbeit eine Nachweisgrenze von 10 *Helicobacter* für ihr Genus-spezifisches real-time PCR Assay an (Drazenovich et al., 2002). Es konnten für die vorgestellte Genus-spezifische real-time PCR keine Kreuzreaktionen mit anderen, relevanten Darmerregern nachgewiesen werden. Unsere neu entwickelte Genus-spezifische real-time PCR ist somit ein sehr sensitives und spezifisches Instrument in der *Helicobacter*-Diagnostik.

Auf Spezies-Ebene wurden konventionelle PCR Protokolle von *H. hepaticus* und *H. bilis* mit der real-time PCR verglichen. Die hier vorgestellte real-time PCR zeigte sich für *H. hepaticus* (Abbildung 4-2) etwa 60 mal sensitiver und für *H. bilis* (Abbildung 4-3) etwa 200.000 mal sensitiver als die entsprechenden konventionellen PCR Protokolle (Fox et al., 1995; Shames et al., 1995). Das für *H. hepaticus* entwickelte Protokoll erwies sich als sehr spezifisch, wo hingegen das für *H. bilis* entwickelte Protokoll geringe Kreuzreaktionen mit *H. hepaticus* aufzeigte. Diese Problematik konnte ebenfalls schon mehrfach mit anderen konventionellen PCR-Assays für *H. bilis* beobachtet werden (Daten nicht angegeben). Da die für den Sensitivitätstest eingesetzte Menge an *Helicobacter*-DNA mit 55,5ng (entspricht etwa $2,85 \times 10^7$ *Helicobacter*-Genomen) vergleichsweise hoch war und der entsprechende C_T-Wert mit >38 ebenfalls sehr hoch war, dürfte diese Kreuzreaktion in der Praxis nur eine untergeordnete

Rolle spielen. BOHR ET AL. stellten 2002 eine konventionelle PCR zum Nachweis von *H. pylori* vor (Bohr et al., 2002). Ihre Nachweisgrenze war mit 100fg (ca. 50 *H. pylori* Genome) etwa 5 mal kleiner als die hier vorgestellte real-time PCR (ca. 250 *H. pylori* Genome). Die von QIANG ET AL. entwickelte real-time PCR für *H. pylori* ist im Vergleich mit den eben beschriebenen Assays mit einer Nachweisgrenze von 1000 *H. pylori* Genomen noch weniger sensitiv.

Für die übrigen real-time PCR-Assays konnte hinsichtlich einer konventionellen PCR kein Vergleich angestellt werden, da zum Zeitpunkt dieser Arbeit keine publizierten konventionellen PCR-Assays vorlagen, welche den Erreger in einem einzigen Schritt nachweisen können. FOX ET AL. nutzten zum Nachweis von *H. cinaedi* einen Genus-spezifischen Primer und führten mit dem gewonnenen PCR-Produkt eine Sequenzierung durch. Es wurde keine Nachweisgrenze angegeben (Fox et al., 2001). Für den Nachweis von *H. muridarum* nutzten MÄHLER ET AL. 2 PCR-Schritte. In einem ersten Schritt konnten *H. hepaticus* und *H. muridarum* von den übrigen *H. spp.* unterschieden werden und zur weiteren Abgrenzung wurde dann über einen *H. hepaticus*-spezifischen Primer zwischen *H. hepaticus* und *H. muridarum* unterschieden. Für *H. hepaticus* wurde eine Nachweisgrenze von 1pg angegeben (Mähler et al., 1998). Die in dieser Arbeit entwickelten real-time PCR Protokolle für *H. muridarum* und *H. cinaedi* zeigten sich allesamt sehr spezifisch und ohne Kreuzreaktivität mit anderen *Helicobacter* Spezies, bzw. anderen ausgewählten Infektionserregern. Die Nachweisgrenze für die hier vorgestellten real-time PCR-Assays betrug für *H. muridarum* 37,5fg und für *H. cinaedi* 24fg.

Es stehen der *Helicobacter*-Diagnostik nunmehr eine größere Anzahl an spezifischen und sensitiven real-time PCR Assays zur Verfügung, welche durch ihre Quantifizierungsmöglichkeit eine genauere Beurteilung des Infektionsstatus zulassen.

5.2 Ermittlung der minimalen infektiösen Dosis

Bei der Ermittlung der minimalen infektiösen Dosis wurden SCID-Mäuse mit den 3 Erregern *H. hepaticus*, *H. bilis* und *H. muridarum* mit unterschiedlich hohen Dosen oral infiziert. Hierbei zeigten sich bemerkenswerte Unterschiede hinsichtlich der Erregerpräsenz nach 42-tägiger Infektionsdauer. *H. hepaticus* zeigte schon bei einer Dosis von 10^4 Keimen ein deutliches infektiöses Potential mit etwa 1500 *Helicobacter*/ng DNA im Caecum. Die Erhöhung der Konzentration auf 10^6 Keime bewirkte keine deutliche Änderung hinsichtlich der nachweisbaren Erregerzahl. Bei der Infektion mit 10^6 Erregern konnten lediglich geringe Mengen von *H. bilis* (ca. 5 *Helicobacter*/ng DNA) im Ileum nachgewiesen werden. Erst ab einer Erregerkonzentration von 10^8 Keimen wurde ein erheblicher

Anstieg von *H. bilis* beobachtet (ca. 600 *Helicobacter*/ng DNA). Unerwartet war die Tatsache, dass selbst bei einer Konzentration von 10^8 Erregern eine nur vergleichsweise sehr geringe Menge von *H. muridarum* (etwa 2 *Helicobacter*/ng DNA) im Ileum nachweisbar war. Dies steht im Widerspruch zu anderen Autoren (Jiang et al., 2002), welche ebenfalls C.B.-17 SCID-Mäuse mit 10^8 *H. muridarum* infizierten und eine persistierende Infektion auslösen konnten. Da in unserem 2. Versuch bei gleicher Infektionsdosis sehr wohl eine Besiedlung mit *H. muridarum* nachgewiesen werden konnte, lässt sich hieraus schlussfolgern, dass möglicherweise die Virulenz des Inokulates von *H. muridarum* im 1. Versuch beeinträchtigt war. Es wurde schon mehrfach von Autoren berichtet, dass die Virulenz eines Bakteriums nach mehrfachen Umzüchtungen erheblich beeinträchtigt sein kann. Betrachtet man die Abbildungen 4-22 bis 4-24, so wird deutlich, dass in diesem Versuch *H. hepaticus* und *H. bilis* ausschließlich im Caecum und im Kot in höheren Zahlen nachgewiesen werden können. Diese Aussage kann im 2. Versuch ebenfalls auf *H. muridarum* ausgedehnt werden. Diese Daten spiegeln nur diejenigen Mengen an *Helicobacter* wieder, welche mindestens benötigt werden um eine Infektion zu induzieren. SCHAEGLER ET AL. legten in ihrer Arbeit dar, dass unterschiedlich hohe Infektionsdosen von Darmerregern, welche die minimale infektiöse Dosis übersteigen, allesamt zu einer gleichstarken Erregerbesiedlung führen. Eine Infektion wird also nach kurzer Zeit einen stabilen Status erreichen, welcher nicht durch die Konzentration des Inokulums bestimmt wird, sondern vielmehr durch den Erreger selbst und die Ernährung des Wirtes (Schaedler and Orcutt, 1983). Demnach ist laut dieser Aussage auch keine Superinfektion mit Darmerregern, beispielsweise durch wiederholte Inokulation mit Erregern zu einem späteren Zeitpunkt möglich. Betrachtet man Abbildung 4-22 bis Abbildung 4-24, so wird am Beispiel von *Helicobacter hepaticus* sehr deutlich, dass eine infektiöse Dosis von 10^4 Keimen für eine Infektion ausreichend ist und durch höhere Keimkonzentrationen nicht nennenswert beeinflusst werden kann.

5.3 Diagnostische Möglichkeiten der Histopathologie

Die histopathologischen Untersuchungen wurden parallel zur real-time PCR durchgeführt. Im Vergleich zur real-time PCR fällt auf, dass nur in 6 Fällen *Helicobacter* histopathologisch nachgewiesen wurden und davon 2 Ergebnisse als fraglichⁿ einzustufen sind. Der Vergleich der unterschiedlichen Färbemethoden zeigt, dass nur die Färbungen nach GIEMSA und WARTHIN-STARRY geeignet sind um *Helicobacter* nachweisen zu können. Überraschenderweise fällt auf, dass die als positiv klassifizierten histopathologischen Ergebnisse in einigen Fällen nicht mit der real-time PCR übereinstimmen. Im Falle von *Helicobacter muridarum* (10^8 /ml) ist für den Bereich des Pylorus der histopathologische Nachweis

ⁿ siehe auch Kapitel 4.2

deutlich positiv, während die real-time PCR für den Fundus negativ ausfällt. Selbst unter Berücksichtigung der Tatsache, dass es sich hierbei um 2 unterschiedliche Loci handelt, müsste man erwarten, dass aufgrund der extrem geringen räumlichen Trennung der beiden Probenahmestellen, die real-time PCR mit ihrer hohen Sensitivität zumindest geringe Mengen *Helicobacter* nachweisen müsste. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte ein falsch positives Ergebnis seitens der Histopathologie sein. Bei *Helicobacter hepaticus* ($10^8/\text{ml}$, $10^6/\text{ml}$ – Caecum) führen beide Nachweisverfahren übereinstimmend zu einem positiven Nachweis. Während jedoch die Histopathologie quantitative Unterschiede nachweist, bewegen sich die durch die real-time PCR nachgewiesenen *Helicobacter*-Zahlen auf derselben Ebene. Keine Übereinstimmung gab es im Falle von *Helicobacter bilis* ($10^8/\text{ml}$ – Caecum) bei dem das histopathologische Ergebnis als „fraglich“ eingestuft wurde, jedoch die real-time PCR hohe Zahlen von *Helicobacter* nachweisen konnte. Vergleicht man die Ergebnisse der real-time PCR und der Histopathologie insgesamt, so wird deutlich, dass die beiden Nachweisverfahren zwar in den meisten Fällen tendenziell übereinstimmen, jedoch erhebliche Unterschiede in Bezug auf die Sensitivität beider Methoden bestehen. Unsere Ergebnisse stehen im Einklang mit den Erfahrungen anderer Autoren (Mähler et al., 1998; Ward et al., 1994) welche berichten, dass die Histopathologie im Bereich der *Helicobacter*-Diagnostik ungenau und somit als diagnostisches Instrument ungeeignet ist. Aufgrund der hohen morphologischen Übereinstimmung der einzelnen Spezies ist eine Speziesdifferenzierung nach allgemeiner Auffassung unmöglich. Eine Abgrenzung des Genus *Helicobacter* von anderen Darmerregern mit ähnlichen morphologischen Eigenschaften wie beispielsweise den nahe verwandten *Campylobacter* spp. ist ebenfalls nicht möglich (Mähler et al., 1998). Besonders im Falle einer geringen *Helicobacter*-Besiedlung im Intestinum, ist der Nachweis in erheblichem Maße von der Erfahrung des Untersuchers abhängig. Ein weiterer Nachteil dieser Methode ist die Tatsache, dass in jedem Fall Tiere für diagnostische Zwecke euthanasiert werden müssen, während unsere entwickelten real-time PCR-Assays neben dem Organnachweis außerdem einen zuverlässigen *Helicobacter*-Nachweis im Kot ermöglichen.

5.4 Zeitlicher Verlauf der Infektion

Im Gegensatz zu Versuch 1 konnte bei der Untersuchung des zeitlichen Infektionsverlaufs zu jeder Zeit bei allen infizierten Tieren eine Infektion mittels real-time PCR nachgewiesen werden. Insgesamt betrachtet bestätigen sich die Beobachtungen aus Versuch 1, dass sowohl für *H. hepaticus*, *H. bilis* als auch für *H. muridarum* das Caecum das primäre Zielorgan zu sein scheint. Betrachtet man die angegebenen *Helicobacter*-Medianwerte für das Caecum, so fällt auf, dass bei allen Spezies bereits ab dem 2. Tag post infectionem sicher zu diagnostizierende *Helicobacter*-Mengen nachweisbar sind. Dies

gilt bei *H. hepaticus* und *H. bilis* zusätzlich für den *Helicobacter*-Nachweis im Kot. Bei *H. muridarum* liegt diese mit 0,14 *Helicobacter*/ng DNA unter der in dieser Arbeit empfohlenen Nachweisgrenze von 0.20 *Helicobacter*/ng DNA und ist somit als fraglich einzustufen. Schon ab dem 4. Infektionstag ist in allen Fällen ein sicherer Nachweis über den Kot möglich. Die real-time PCR ermöglicht somit einen, im Vergleich zur konventionellen PCR, früheren Erreger-Nachweis im Kot, da die meisten Autoren mit der konventionellen PCR erst nach etwa 1 Woche *Helicobacter* erfolgreich im Kot nachweisen konnten (Shomer et al., 1997). BURICH ET AL. infizierten IL10- und T-Zell-defiziente Mäuse mit *H. bilis* und *H. hepaticus* und konnten erst nach 2-4 Wochen eine Infektion über den Kot nachweisen (Burich et al., 2001).

Im relativen Vergleich der *Helicobacter*-Spezies untereinander wird deutlich, dass, analog zu Versuch 1, *H. hepaticus* das größte Potential besitzt sich im Wirt zu vermehren. Es folgen danach *H. bilis* und zuletzt *H. muridarum*. Interessanterweise kommt es bei allen Spezies nach dem 2. Tag post infectionem zu einem massiven Anstieg der Keimzahlen bis zu Tag 4. Anschließend fallen die Keimzahlen wieder stark ab um schließlich bis Tag 40 wieder anzusteigen. Dieser Anstieg übertrifft bei *H. hepaticus* die Keimzahl von Tag 4 etwa um das 2,5-fache, bei *H. bilis* erreicht er ungefähr den Initialwert von Tag 4 und bei *H. muridarum* nur etwa ein Drittel von Tag 4 (siehe Daten im Anhang).

Wie durch die Abbildung 4-25 bis Abbildung 4-35 ersichtlich wird, sollte bei einer Ganztieruntersuchung unbedingt das Caecum als Probenahmestelle gewählt werden. Im Einzelfall kann sicherlich auch *Helicobacter* spp. durch eine DNA-Extraktion aus beispielsweise Leber oder Jejunum nachgewiesen werden, jedoch konnte mit dieser Studie eindeutig belegt werden, dass unter den infizierten Tieren einzig das Caecum konstant hohe Keimzahlen aufweist und demnach idealer Ort für eine Probenahme ist. Diese Studie konnte ebenfalls zeigen, dass die DNA-Extraktion aus Kot ein zuverlässiger Indikator für eine *Helicobacter*-Infektion darstellt. In allen Fällen konnten Tiere welche über das Caecum als *Helicobacter*-positiv bewertet wurden, ebenfalls über den Kot als *Helicobacter*-positiv beurteilt werden. BECKWITH ET AL. untersuchten ebenfalls die Nachweisbarkeit von *Helicobacter* spp. im Kot. Sie konnten zeigen, dass sich unbehandelter Kot auch nach 7 Tagen noch für eine DNA-Extraktion und den anschließenden Nachweis von *Helicobacter* spp. eignet (Beckwith et al., 1997). Im Kot vorhandene Substanzen, welche als PCR-Inhibitoren fungieren, sind bereits von diversen Autoren beschrieben worden (Monteiro et al., 1997). In der Praxis scheinen sie jedoch für die *Helicobacter*-Diagnostik eine nur untergeordnete Rolle zu spielen. Es wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass sich diese Methode in Verbindung mit unseren neu entwickelten PCR-Assays sehr gut in der

Routinediagnostik einsetzen lässt und einen erheblichen Beitrag zur Reduktion der Versuchstierzahlen im Sinne von „3R“^o leisten kann.

Wir konnten bezüglich der eingesetzten Sentinel-Tiere zeigen, dass es bei allen *Helicobacter*-Spezies nach spätestens 40 Tage post infectionem zu einer eindeutig nachweisbaren Infektion der Sentinels kam. Entsprechend seinem pathologischen Potential, konnten wir in immunkompetenten NMRI-Sentinels, bereits nach 7 Tagen *H. hepaticus* im Jejunum nachweisen. Ebenfalls nach 7 Tagen konnte in *H. bilis* -infizierten SCID-Sentinels *Helicobacter* im Kot nachgewiesen werden. Bei *H. muridarum* war ein Nachweis in immundefizienten SCID-Sentinels frühestens nach 40 Tagen möglich. Interessanterweise konnten wir hier hohe Keimzahlen im Ileum nachweisen, obwohl das Ileum ansonsten für den *Helicobacter*-Nachweis gänzlich ungeeignet schien. Unter Berücksichtigung der Resultate in der Datentabelle im Anhang 6.2, scheint dies jedoch eine Ausnahme zu sein, da alle anderen Sentinels dieser Gruppe *Helicobacter*-negativ waren. Obwohl in dieser Arbeit gezeigt wurde, dass sich *Helicobacter*-Infektionen zweifelsohne auf immunkompetente NMRI-Sentinels übertragen lassen, scheinen SCID-Sentinels die bessere Wahl für ein Sentinel-Programm zu sein. Es konnte bei allen 3 *Helicobacter*-Spezies nach einer Expositionsdauer von 40 Tagen eine Übertragung auf SCID-Sentinels nachgewiesen werden. In einer weiteren Arbeit sollte detaillierter abgeklärt werden, ab wann sich zwischen Tag 14 und Tag 40 post infectionem frühestens zuverlässige Keimzahlen ermitteln lassen.

5.5 Serologie als Nachweismethode

Serologische Nachweismethoden wie z.B. ELISA haben sich in der Erregerdiagnostik als potente und sehr wirtschaftliche Nachweismethoden etabliert. Inwieweit sich diese Methode in der *Helicobacter*-Diagnostik in Bezug auf Sentinels eignet, sollte in dieser Arbeit überprüft werden. FOX ET AL. zeigten auf, dass infizierte Mäuse *H. hepaticus* spezifische Immunglobuline bilden, eine Serokonversion jedoch erst bei mindestens 6 Monate alten Tieren nachweisbar war (Fox et al., 1996). LIVINGSTON ET AL. beschrieben einen Spezies-spezifischen ELISA für *H. hepaticus*, welcher eine Sensitivität von 93% und eine Spezifität von 94% aufwies. Sie konnten bereits 14 Tage post infectionem *H. hepaticus* spezifische Antikörper nachweisen (Livingston et al., 1997). Die zeitlichen Unterschiede lassen sich möglicherweise damit erklären, dass FOX ET AL. mit natürlich infizierten Tieren, LIVINGSTON ET AL. dagegen mit künstlich infizierten Mäusen experimentierten. In der vorliegenden Arbeit konnte nur bei *H. hepaticus* und *H. muridarum* eine Serokonversion beobachtet werden. Bis zum Tag 14 post

^o Reduction, Refinement, Replacement

infectionem konnten keine bedeutsamen Änderungen festgestellt werden. Ab Tag 40 wurde für *H. hepaticus* und *H. muridarum* ein deutlicher Anstieg der OD's beobachtet. Zu den in diesem Versuch als seropositiv eingestuften Mäusen gehörten ausschließlich NMRI-Mäuse. Dies war im Ergebnis zu erwarten, da SCID-Mäuse immundefizient und serologisch gar nicht in der Lage sind mit einer deutlichen Serokonversion auf die Antigen-Exposition zu reagieren. Dies verdeutlicht den gravierenden Nachteil der Serologie gegenüber der PCR. Neben den Protokollen für *H. hepaticus* gibt es zur Zeit keine validierten ELISA's für andere *Helicobacter* spp. Aufgrund der geringen Spezifität kommt es immer wieder zu Kreuzreaktionen, so dass eine Speziesidentifizierung zur Zeit noch nicht hinreichend genau möglich ist (Whary et al., 2000). Da die Serologie eine Immunantwort des Wirtes erfordert, ist sie zudem generell für alle immundefizienten Tiere ungeeignet. Selbst bei Tieren, welche von ihrem genetischen Hintergrund her ein intaktes Immunsystem aufweisen, können Haltungsbedingungen oder Erkrankungen dazu führen, dass sie einen immunologischen Reiz nicht mehr ausreichend beantworten können. Die real-time PCR lässt zwar, wie auch die serologischen Methoden, keine Beurteilung des tatsächlichen klinischen Erkrankungsstatus zu, jedoch bietet sie die Möglichkeit einer qualitativen und quantitativen Aussage, welche unabhängig vom Immunstatus des Tieres ist.

5.6 Schlussfolgerungen

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass in dieser Arbeit mit den neu entwickelten real-time PCR-Assays für eine größere Gruppe von *Helicobacter* spp. eine sehr sensitive und spezifische Nachweismethode etabliert werden konnte. Andere Nachweismethoden wie die konventionelle PCR, die histopathologische Untersuchung oder der ELISA, erwiesen sich als weniger sensitiv und/oder zu unspezifisch. Im Tierversuch wurde die minimale infektiöse Dosis von *H. hepaticus* und *H. bilis* bestimmt. Sie lag bei *H. hepaticus* bei 10^4 Erregern, bei *H. bilis* bei 10^8 Erregern. Es ist in weiteren Versuchen abzuklären, ob für *H. hepaticus* auch geringere Infektionsdosen noch zu einer Infektion führen können.

Für *H. muridarum* konnte keine minimale infektiöse Dosis bestimmt werden, da das Inokulum in Versuch 1 aus unbekannten Gründen eine ungenügende Virulenz aufwies. Die in Versuch 2 eingesetzte Erregermenge von 10^8 *H. muridarum* reichte jedoch aus um eine Infektion auszulösen.

Bei der Untersuchung des zeitlichen Infektionsverlaufes konnte gezeigt werden, dass bei einer Ganztieruntersuchung schon nach 2 Tagen deutliche *Helicobacter*-Mengen im Caecum nachweisbar sind und das Caecum auch als Probenahmestelle der 1. Wahl dienen sollte. Ab dem 4. Tag post infectionem konnte auch über den Kot eine *Helicobacter*-Infektion zuverlässig nachgewiesen werden.

Bei den Sentinel-Tieren zeigten sich SCID-Sentinels als empfänglicher für *Helicobacter*-Infektionen als NMRI-Sentinels. Bei SCID-Sentinels konnten nach etwa 40 Tagen *H. hepaticus*, *H. bilis* und *H. muridarum* sicher über den Kot nachgewiesen werden.

Durch genaue Kenntnis des *Helicobacter*-Status lassen sich unerwünschte Erregereinflüsse auf den Versuch schon im Vorfeld minimieren. Dies führt zu präziseren Versuchsergebnissen und letztlich, über eine geringere Streuung der Versuchsergebnisse, zu einer Reduktion der für den Versuch benötigten Tierzahlen. Die hier vorgestellte Möglichkeit des Erregernachweises über die DNA-Extraktion aus Kot trägt darüber hinaus zu einer Reduktion der Tierzahlen bei, da keine Tiere mehr zu diagnostischen Zwecken euthanasiert werden müssen.

6 Anhang: Ergebnistabellen

6.1 Versuch 1: Erregerpathogenität und minimale infektiöse Dosis

Probenmaterial	Maus Nr.	Inf. Dosis /ml	Helicobacter/ng DNA
Leber	1	Hep 10^8	9,13
	2	Hep 10^8	12,55
	3	Hep 10^8	13,37
	4	Bilis 10^8	0,01
	5	Bilis 10^8	0,00
	6	Bilis 10^8	0,00
	7	Mur 10^8	0,01
	8	Mur 10^8	0,00
	9	Mur 10^8	0,01
	10	Hep 10^6	0,14
	11	Hep 10^6	0,58
	12	Hep 10^6	0,72
	13	Bilis 10^6	0,00
	14	Bilis 10^6	0,00
	15	Bilis 10^6	0,00
	16	Mur 10^6	0,00
	17	Mur 10^6	0,00
	18	Mur 10^6	0,00
	19	Hep 10^4	2,27
	20	Hep 10^4	2,27
	21	Hep 10^4	0,25
	22	Bilis 10^4	0,01
	23	Bilis 10^4	0,00
	24	Bilis 10^4	0,02
	25	Mur 10^4	0,00
	26	Mur 10^4	0,01
	27	Mur 10^4	0,00
	28	Kontrolle	0,00
	29	Kontrolle	0,00
	30	Kontrolle	0,00

Probenmaterial	Maus Nr.	Inf. Dosis /ml	Helicobacter/ng DNA
Fundus	1	Hep 10 ⁸	2,64
	2	Hep 10 ⁸	0,06
	3	Hep 10 ⁸	0,01
	4	Bilis 10 ⁸	0,00
	5	Bilis 10 ⁸	0,00
	6	Bilis 10 ⁸	0,20
	7	Mur 10 ⁸	0,00
	8	Mur 10 ⁸	0,00
	9	Mur 10 ⁸	0,01
	10	Hep 10 ⁶	0,00
	11	Hep 10 ⁶	0,00
	12	Hep 10 ⁶	0,03
	13	Bilis 10 ⁶	0,51
	14	Bilis 10 ⁶	0,00
	15	Bilis 10 ⁶	0,01
	16	Mur 10 ⁶	0,09
	17	Mur 10 ⁶	0,01
	18	Mur 10 ⁶	0,64
	19	Hep 10 ⁴	0,02
	20	Hep 10 ⁴	0,00
	21	Hep 10 ⁴	0,11
	22	Bilis 10 ⁴	0,08
	23	Bilis 10 ⁴	0,01
	24	Bilis 10 ⁴	0,04
	25	Mur 10 ⁴	0,05
	26	Mur 10 ⁴	0,05
	27	Mur 10 ⁴	0,03
	28	Kontrolle	0,01
	29	Kontrolle	0,00
	30	Kontrolle	0,00

Probenmaterial	Maus Nr.	Inf. Dosis /ml	Helicobacter/ng DNA
Jejunum-Mitte	1	Hep 10 ⁸	0,00
	2	Hep 10 ⁸	0,00
	3	Hep 10 ⁸	0,05
	4	Bilis 10 ⁸	0,01
	5	Bilis 10 ⁸	0,00
	6	Bilis 10 ⁸	0,00
	7	Mur 10 ⁸	0,02
	8	Mur 10 ⁸	0,00
	9	Mur 10 ⁸	0,09
	10	Hep 10 ⁶	0,00
	11	Hep 10 ⁶	0,00
	12	Hep 10 ⁶	0,00
	13	Bilis 10 ⁶	0,01
	14	Bilis 10 ⁶	0,00
	15	Bilis 10 ⁶	0,00
	16	Mur 10 ⁶	0,00
	17	Mur 10 ⁶	0,00
	18	Mur 10 ⁶	0,01
	19	Hep 10 ⁴	0,13
	20	Hep 10 ⁴	0,02
	21	Hep 10 ⁴	0,02
	22	Bilis 10 ⁴	0,07
	23	Bilis 10 ⁴	0,01
	24	Bilis 10 ⁴	0,01
	25	Mur 10 ⁴	0,00
	26	Mur 10 ⁴	0,00
	27	Mur 10 ⁴	0,00
	28	Kontrolle	0,00
	29	Kontrolle	0,00
	30	Kontrolle	0,00

Probenmaterial	Maus Nr.	Inf. Dosis /ml	Helicobacter/ng DNA
Ileum	1	Hep 10^8	23,64
	2	Hep 10^8	158,27
	3	Hep 10^8	70,52
	4	Bilis 10^8	4,45
	5	Bilis 10^8	1,60
	6	Bilis 10^8	2,38
	7	Mur 10^8	3,44
	8	Mur 10^8	2,26
	9	Mur 10^8	3,21
	10	Hep 10^6	898,02
	11	Hep 10^6	0,66
	12	Hep 10^6	1,95
	13	Bilis 10^6	31,78
	14	Bilis 10^6	3,70
	15	Bilis 10^6	0,86
	16	Mur 10^6	2,12
	17	Mur 10^6	0,98
	18	Mur 10^6	0,73
	19	Hep 10^4	1,44
	20	Hep 10^4	32,07
	21	Hep 10^4	0,35
	22	Bilis 10^4	0,56
	23	Bilis 10^4	0,88
	24	Bilis 10^4	1,51
	25	Mur 10^4	0,66
	26	Mur 10^4	0,65
	27	Mur 10^4	0,12
	28	Kontrolle	0,00
	29	Kontrolle	0,00
	30	Kontrolle	0,00

Probenmaterial	Maus Nr.	Inf. Dosis /ml	Helicobacter/ng DNA
Caecum	1	Hep 10 ⁸	1914,86
	2	Hep 10 ⁸	2002,99
	3	Hep 10 ⁸	771,66
	4	Bilis 10 ⁸	603,14
	5	Bilis 10 ⁸	189,84
	6	Bilis 10 ⁸	2893,47
	7	Mur 10 ⁸	0,00
	8	Mur 10 ⁸	0,01
	9	Mur 10 ⁸	0,03
	10	Hep 10 ⁶	1494,03
	11	Hep 10 ⁶	780,81
	12	Hep 10 ⁶	1397,53
	13	Bilis 10 ⁶	0,09
	14	Bilis 10 ⁶	0,05
	15	Bilis 10 ⁶	0,04
	16	Mur 10 ⁶	0,04
	17	Mur 10 ⁶	0,01
	18	Mur 10 ⁶	0,00
	19	Hep 10 ⁴	1668,04
	20	Hep 10 ⁴	4,89
	21	Hep 10 ⁴	1485,73
	22	Bilis 10 ⁴	0,45
	23	Bilis 10 ⁴	0,00
	24	Bilis 10 ⁴	0,00
	25	Mur 10 ⁴	0,01
	26	Mur 10 ⁴	0,00
	27	Mur 10 ⁴	0,01
	28	Kontrolle	0,00
	29	Kontrolle	0,00
	30	Kontrolle	0,00

Probenmaterial	Maus Nr.	Inf. Dosis /ml	Helicobacter/ng DNA
Colon prox.	1	Hep 10 ⁸	22,54
	2	Hep 10 ⁸	19,39
	3	Hep 10 ⁸	96,09
	4	Bilis 10 ⁸	4,70
	5	Bilis 10 ⁸	39,30
	6	Bilis 10 ⁸	5,84
	7	Mur 10 ⁸	0,12
	8	Mur 10 ⁸	0,01
	9	Mur 10 ⁸	0,01
	10	Hep 10 ⁶	3,14
	11	Hep 10 ⁶	4,03
	12	Hep 10 ⁶	4,28
	13	Bilis 10 ⁶	0,01
	14	Bilis 10 ⁶	0,00
	15	Bilis 10 ⁶	0,01
	16	Mur 10 ⁶	0,00
	17	Mur 10 ⁶	0,00
	18	Mur 10 ⁶	0,00
	19	Hep 10 ⁴	124,01
	20	Hep 10 ⁴	72,70
	21	Hep 10 ⁴	60,54
	22	Bilis 10 ⁴	0,00
	23	Bilis 10 ⁴	0,01
	24	Bilis 10 ⁴	0,00
	25	Mur 10 ⁴	0,00
	26	Mur 10 ⁴	0,00
	27	Mur 10 ⁴	0,00
	28	Kontrolle	0,00
	29	Kontrolle	0,00
	30	Kontrolle	0,00

Probenmaterial	Maus Nr.	Inf. Dosis /ml	Helicobacter/ng DNA
Kot	1	Hep 10 ⁸	643,90
	2	Hep 10 ⁸	1032,04
	3	Hep 10 ⁸	18,65
	4	Bilis 10 ⁸	843,36
	5	Bilis 10 ⁸	249,22
	6	Bilis 10 ⁸	39,98
	7	Mur 10 ⁸	0,03
	8	Mur 10 ⁸	0,00
	9	Mur 10 ⁸	0,00
	10	Hep 10 ⁶	29,70
	11	Hep 10 ⁶	382,27
	12	Hep 10 ⁶	539,42
	13	Bilis 10 ⁶	0,09
	14	Bilis 10 ⁶	0,06
	15	Bilis 10 ⁶	0,16
	16	Mur 10 ⁶	0,01
	17	Mur 10 ⁶	0,00
	18	Mur 10 ⁶	0,01
	19	Hep 10 ⁴	2096,71
	20	Hep 10 ⁴	1402,34
	21	Hep 10 ⁴	358,69
	22	Bilis 10 ⁴	0,09
	23	Bilis 10 ⁴	0,09
	24	Bilis 10 ⁴	0,01
	25	Mur 10 ⁴	0,00
	26	Mur 10 ⁴	0,10
	27	Mur 10 ⁴	0,00
	28	Kontrolle	0,00
	29	Kontrolle	0,00
	30	Kontrolle	0,00

Tabelle 6-1

6.2 Versuch 2: Zeitlicher Verlauf der Infektion

Probenmaterial	Tier	Probennummer	Helicobacter/ng DNA
Zeitlicher Verlauf Tag 2 Leber	Tier Nr.1 H.bilis	1	0,00
	Tier Nr.2 H.bilis	9	0,00
	Tier Nr.3 H.bilis	17	0,00
	Tier Nr.1 H.hep	25	0,33
	Tier Nr.2 H.hep	33	0,01
	Tier Nr.3 H.hep	41	0,00
	Tier Nr.1 H.mur	49	0,01
	Tier Nr.2 H.mur	57	0,00
	Tier Nr.3 H.mur	65	0,00
Zeitlicher Verlauf Tag 2 Fundus	Tier Nr.1 H.bilis	2	0,00
	Tier Nr.2 H.bilis	10	0,00
	Tier Nr.3 H.bilis	18	0,00
	Tier Nr.1 H.hep	26	0,08
	Tier Nr.2 H.hep	34	0,01
	Tier Nr.3 H.hep	42	0,00
	Tier Nr.1 H.mur	50	0,00
	Tier Nr.2 H.mur	58	0,00
	Tier Nr.3 H.mur	66	0,00
Zeitlicher Verlauf Tag 2 Duodenum	Tier Nr.1 H.bilis	3	0,00
	Tier Nr.2 H.bilis	11	0,00
	Tier Nr.3 H.bilis	19	0,00
	Tier Nr.1 H.hep	27	0,39
	Tier Nr.2 H.hep	35	0,01
	Tier Nr.3 H.hep	43	0,26
	Tier Nr.1 H.mur	51	0,25
	Tier Nr.2 H.mur	59	0,00
	Tier Nr.3 H.mur	67	0,00
Zeitlicher Verlauf Tag 2 Jejunum prox.	Tier Nr.1 H.bilis	4	0,00
	Tier Nr.2 H.bilis	12	0,00
	Tier Nr.3 H.bilis	20	0,01
	Tier Nr.1 H.hep	28	0,01
	Tier Nr.2 H.hep	36	0,03
	Tier Nr.3 H.hep	44	0,00
	Tier Nr.1 H.mur	52	0,00
	Tier Nr.2 H.mur	60	0,00

Probenmaterial	Tier	Probennummer	Helicobacter/ng DNA
	Tier Nr.3 H.mur	68	0,01
Zeitlicher Verlauf Tag 2 Ileum	Tier Nr.1 H.bilis	5	0,00
	Tier Nr.2 H.bilis	13	0,00
	Tier Nr.3 H.bilis	21	0,02
	Tier Nr.1 H.hep	29	0,01
	Tier Nr.2 H.hep	37	0,02
	Tier Nr.3 H.hep	45	0,03
	Tier Nr.1 H.mur	53	0,08
	Tier Nr.2 H.mur	61	0,05
	Tier Nr.3 H.mur	69	0,05
Zeitlicher Verlauf Tag 2 Caecum	Tier Nr.1 H.bilis	6	0,49
	Tier Nr.2 H.bilis	14	3,59
	Tier Nr.3 H.bilis	22	3,43
	Tier Nr.1 H.hep	30	272,83
	Tier Nr.2 H.hep	38	45,62
	Tier Nr.3 H.hep	46	8,55
	Tier Nr.1 H.mur	54	22,17
	Tier Nr.2 H.mur	62	30,93
	Tier Nr.3 H.mur	70	9,25
Zeitlicher Verlauf Tag 2 Colon prox.	Tier Nr.1 H.bilis	7	0,22
	Tier Nr.2 H.bilis	15	0,16
	Tier Nr.3 H.bilis	23	1,35
	Tier Nr.1 H.hep	31	1,98
	Tier Nr.2 H.hep	39	0,70
	Tier Nr.3 H.hep	47	0,29
	Tier Nr.1 H.mur	55	0,07
	Tier Nr.2 H.mur	63	0,08
	Tier Nr.3 H.mur	71	3,26
Zeitlicher Verlauf Tag 2 Kot	Tier Nr.1 H.bilis	8	0,04
	Tier Nr.2 H.bilis	16	1,01
	Tier Nr.3 H.bilis	24	1,51
	Tier Nr.1 H.hep	32	17,54
	Tier Nr.2 H.hep	40	1,72
	Tier Nr.3 H.hep	48	3,42
	Tier Nr.1 H.mur	56	0,59
	Tier Nr.2 H.mur	64	0,14
	Tier Nr.3 H.mur	72	0,05

Probenmaterial	Tier	Probennummer	Helicobacter/ng DNA
Zeitlicher Verlauf Tag 4 Leber	Tier Nr.1 H.bilis	1	0,00
	Tier Nr.2 H.bilis	9	0,00
	Tier Nr.3 H.bilis	17	0,00
	Tier Nr.1 H.hep	25	0,00
	Tier Nr.2 H.hep	33	0,00
	Tier Nr.3 H.hep	41	0,05
	Tier Nr.1 H.mur	49	0,01
	Tier Nr.2 H.mur	57	0,01
	Tier Nr.3 H.mur	65	0,03
Zeitlicher Verlauf Tag 4 Fundus	Tier Nr.1 H.bilis	2	0,01
	Tier Nr.2 H.bilis	10	0,00
	Tier Nr.3 H.bilis	18	0,00
	Tier Nr.1 H.hep	26	0,00
	Tier Nr.2 H.hep	34	0,00
	Tier Nr.3 H.hep	42	0,01
	Tier Nr.1 H.mur	50	0,01
	Tier Nr.2 H.mur	58	0,02
	Tier Nr.3 H.mur	66	0,00
Zeitlicher Verlauf Tag 4 Duodenum	Tier Nr.1 H.bilis	3	0,00
	Tier Nr.2 H.bilis	11	0,00
	Tier Nr.3 H.bilis	19	0,00
	Tier Nr.1 H.hep	27	0,00
	Tier Nr.2 H.hep	35	0,00
	Tier Nr.3 H.hep	43	0,01
	Tier Nr.1 H.mur	51	0,00
	Tier Nr.2 H.mur	59	0,00
	Tier Nr.3 H.mur	67	0,00
Zeitlicher Verlauf Tag 4 Jejunum prox.	Tier Nr.1 H.bilis	4	0,00
	Tier Nr.2 H.bilis	12	0,00
	Tier Nr.3 H.bilis	20	0,01
	Tier Nr.1 H.hep	28	0,00
	Tier Nr.2 H.hep	36	0,00
	Tier Nr.3 H.hep	44	0,00
	Tier Nr.1 H.mur	52	0,01
	Tier Nr.2 H.mur	60	0,00
	Tier Nr.3 H.mur	68	0,00

Probenmaterial	Tier	Probennummer	Helicobacter/ng DNA
Zeitlicher Verlauf Tag 4 Ileum	Tier Nr.1 H.bilis	5	0,00
	Tier Nr.2 H.bilis	13	0,00
	Tier Nr.3 H.bilis	21	0,05
	Tier Nr.1 H.hep	29	0,03
	Tier Nr.2 H.hep	37	0,00
	Tier Nr.3 H.hep	45	28,69
	Tier Nr.1 H.mur	53	77,25
	Tier Nr.2 H.mur	61	0,06
	Tier Nr.3 H.mur	69	0,01
Zeitlicher Verlauf Tag 4 Caecum	Tier Nr.1 H.bilis	6	38,57
	Tier Nr.2 H.bilis	14	369,17
	Tier Nr.3 H.bilis	22	603,62
	Tier Nr.1 H.hep	30	763,65
	Tier Nr.2 H.hep	38	40,44
	Tier Nr.3 H.hep	46	666,76
	Tier Nr.1 H.mur	54	109,24
	Tier Nr.2 H.mur	62	118,13
	Tier Nr.3 H.mur	70	74,12
Zeitlicher Verlauf Tag 4 Colon prox.	Tier Nr.1 H.bilis	7	1,91
	Tier Nr.2 H.bilis	15	0,87
	Tier Nr.3 H.bilis	23	3,61
	Tier Nr.1 H.hep	31	0,59
	Tier Nr.2 H.hep	39	6,75
	Tier Nr.3 H.hep	47	16,81
	Tier Nr.1 H.mur	55	1,33
	Tier Nr.2 H.mur	63	163,04
	Tier Nr.3 H.mur	71	4,01
Zeitlicher Verlauf Tag 4 Kot	Tier Nr.1 H.bilis	8	22,48
	Tier Nr.2 H.bilis	16	72,01
	Tier Nr.3 H.bilis	24	61,92
	Tier Nr.1 H.hep	32	166,83
	Tier Nr.2 H.hep	40	55,07
	Tier Nr.3 H.hep	48	154,35
	Tier Nr.1 H.mur	56	1,95
	Tier Nr.2 H.mur	64	5,12
	Tier Nr.3 H.mur	72	0,46

Probenmaterial	Tier	Probennummer	Helicobacter/ng DNA
Zeitlicher Verlauf Tag 7 H.bilis - Leber	Tier Nr.1 H.bilis	1	0,00
	Tier Nr.2 H.bilis	9	0,02
	Tier Nr.3 H.bilis	17	0,00
	Sent. 1 NMRI	25	0,00
	Sent. 2 NMRI	33	1,61
	Sent. 1 SCID	41	0,00
	Sent. 2 SCID	49	0,00
Zeitlicher Verlauf Tag 7 H.bilis - Fundus	Tier Nr.1 H.bilis	2	0,00
	Tier Nr.2 H.bilis	10	3,81
	Tier Nr.3 H.bilis	18	0,00
	Sent. 1 NMRI	26	0,00
	Sent. 2 NMRI	34	0,00
	Sent. 1 SCID	42	0,00
	Sent. 2 SCID	50	0,00
Zeitlicher Verlauf Tag 7 H.bilis - Duodenum	Tier Nr.1 H.bilis	3	0,02
	Tier Nr.2 H.bilis	11	0,00
	Tier Nr.3 H.bilis	19	0,00
	Sent. 1 NMRI	27	0,00
	Sent. 2 NMRI	35	0,00
	Sent. 1 SCID	43	0,00
	Sent. 2 SCID	51	0,00
Zeitlicher Verlauf Tag 7 H.bilis - Jejunum prox.	Tier Nr.1 H.bilis	4	0,01
	Tier Nr.2 H.bilis	12	0,00
	Tier Nr.3 H.bilis	20	0,00
	Sent. 1 NMRI	28	0,00
	Sent. 2 NMRI	36	0,01
	Sent. 1 SCID	44	0,00
	Sent. 2 SCID	52	0,00
Zeitlicher Verlauf Tag 7 H.bilis - Ileum	Tier Nr.1 H.bilis	5	0,00
	Tier Nr.2 H.bilis	13	0,00
	Tier Nr.3 H.bilis	21	0,00
	Sent. 1 NMRI	29	0,00
	Sent. 2 NMRI	37	0,00
	Sent. 1 SCID	45	0,00
	Sent. 2 SCID	53	0,01
Zeitlicher Verlauf Tag 7 H.bilis - Caecum	Tier Nr.1 H.bilis	6	630,69
	Tier Nr.2 H.bilis	14	186,22
	Tier Nr.3 H.bilis	22	119,94

Probenmaterial	Tier	Probennummer	Helicobacter/ng DNA
	Sent. 1 NMRI	30	0,00
	Sent. 2 NMRI	38	0,00
	Sent. 1 SCID	46	0,05
	Sent. 2 SCID	54	0,00
Zeitlicher Verlauf Tag 7 H.bilis - Colon prox.	Tier Nr.1 H.bilis	7	1,43
	Tier Nr.2 H.bilis	15	4,96
	Tier Nr.3 H.bilis	23	19,30
	Sent. 1 NMRI	31	0,00
	Sent. 2 NMRI	39	0,00
	Sent. 1 SCID	47	0,00
	Sent. 2 SCID	55	0,00
Zeitlicher Verlauf Tag 7 H.bilis - Kot	Tier Nr.1 H.bilis	8	36,98
	Tier Nr.2 H.bilis	16	5,99
	Tier Nr.3 H.bilis	24	36,71
	Sent. 1 NMRI	32	21,19
	Sent. 2 NMRI	40	0,00
	Sent. 1 SCID	48	0,00
	Sent. 2 SCID	56	0,00
Zeitlicher Verlauf Tag 7 H.hep - Leber	Tier Nr.1 H.hep	1	0,00
	Tier Nr.2 H.hep	9	0,00
	Tier Nr.3 H.hep	17	0,00
	Sent. 1 NMRI	25	0,02
	Sent. 2 NMRI	33	0,00
	Sent. 1 SCID	41	0,00
	Sent. 2 SCID	49	0,01
Zeitlicher Verlauf Tag 7 H.hep - Fundus	Tier Nr.1 H.hep	2	0,00
	Tier Nr.2 H.hep	10	0,00
	Tier Nr.3 H.hep	18	0,00
	Sent. 1 NMRI	26	0,01
	Sent. 2 NMRI	34	0,00
	Sent. 1 SCID	42	0,00
	Sent. 2 SCID	50	0,00
Zeitlicher Verlauf Tag 7 H.hep - Duodenum	Tier Nr.1 H.hep	3	0,00
	Tier Nr.2 H.hep	11	0,01
	Tier Nr.3 H.hep	19	0,00
	Sent. 1 NMRI	27	0,00
	Sent. 2 NMRI	35	0,01
	Sent. 1 SCID	43	0,00

Probenmaterial	Tier	Probennummer	Helicobacter/ng DNA
	Sent. 2 SCID	51	0,00
Zeitlicher Verlauf Tag 7 H.hep - Jejunum prox.	Tier Nr.1 H.hep	4	0,06
	Tier Nr.2 H.hep	12	0,00
	Tier Nr.3 H.hep	20	0,00
	Sent. 1 NMRI	28	1,25
	Sent. 2 NMRI	36	0,00
	Sent. 1 SCID	44	0,01
	Sent. 2 SCID	52	0,00
Zeitlicher Verlauf Tag 7 H.hep - Ileum	Tier Nr.1 H.hep	5	0,00
	Tier Nr.2 H.hep	13	0,00
	Tier Nr.3 H.hep	21	0,01
	Sent. 1 NMRI	29	0,00
	Sent. 2 NMRI	37	0,00
	Sent. 1 SCID	45	0,00
	Sent. 2 SCID	53	0,00
Zeitlicher Verlauf Tag 7 H.hep - Caecum	Tier Nr.1 H.hep	6	85,71
	Tier Nr.2 H.hep	14	37,02
	Tier Nr.3 H.hep	22	281,94
	Sent. 1 NMRI	30	0,01
	Sent. 2 NMRI	38	0,00
	Sent. 1 SCID	46	0,01
	Sent. 2 SCID	54	0,00
Zeitlicher Verlauf Tag 7 H.hep - Colon prox.	Tier Nr.1 H.hep	7	6,25
	Tier Nr.2 H.hep	15	0,87
	Tier Nr.3 H.hep	23	203,10
	Sent. 1 NMRI	31	0,00
	Sent. 2 NMRI	39	0,02
	Sent. 1 SCID	47	0,02
	Sent. 2 SCID	55	0,01
Zeitlicher Verlauf Tag 7 H.hep - Kot	Tier Nr.1 H.hep	8	54,64
	Tier Nr.2 H.hep	16	65,70
	Tier Nr.3 H.hep	24	26,90
	Sent. 1 NMRI	32	0,01
	Sent. 2 NMRI	40	0,00
	Sent. 1 SCID	48	0,07
	Sent. 2 SCID	56	0,01

Probenmaterial	Tier	Probennummer	Helicobacter/ng DNA
Zeitlicher Verlauf Tag 7 H.mur - Leber	Tier Nr.1 H.mur	1	0,00
	Tier Nr.2 H.mur	9	0,00
	Tier Nr.3 H.mur	17	0,00
	Sent. 1 NMRI	25	0,00
	Sent. 2 NMRI	33	0,00
	Sent. 1 SCID	41	0,00
	Sent. 2 SCID	49	0,00
Zeitlicher Verlauf Tag 7 H.mur - Fundus	Tier Nr.1 H.mur	2	0,00
	Tier Nr.2 H.mur	10	0,00
	Tier Nr.3 H.mur	18	0,00
	Sent. 1 NMRI	26	0,00
	Sent. 2 NMRI	34	0,00
	Sent. 1 SCID	42	0,00
	Sent. 2 SCID	50	0,00
Zeitlicher Verlauf Tag 7 H.mur - Duodenum	Tier Nr.1 H.mur	3	0,00
	Tier Nr.2 H.mur	11	0,00
	Tier Nr.3 H.mur	19	0,02
	Sent. 1 NMRI	27	0,00
	Sent. 2 NMRI	35	0,00
	Sent. 1 SCID	43	0,00
	Sent. 2 SCID	51	0,01
Zeitlicher Verlauf Tag 7 H.mur - Jejunum prox.	Tier Nr.1 H.mur	4	0,00
	Tier Nr.2 H.mur	12	0,01
	Tier Nr.3 H.mur	20	0,00
	Sent. 1 NMRI	28	0,00
	Sent. 2 NMRI	36	0,01
	Sent. 1 SCID	44	0,01
	Sent. 2 SCID	52	0,00
Zeitlicher Verlauf Tag 7 H.mur - Ileum	Tier Nr.1 H.mur	5	0,02
	Tier Nr.2 H.mur	13	0,00
	Tier Nr.3 H.mur	21	0,01
	Sent. 1 NMRI	29	0,00
	Sent. 2 NMRI	37	0,00
	Sent. 1 SCID	45	0,00
	Sent. 2 SCID	53	0,00
Zeitlicher Verlauf Tag 7 H.mur - Caecum	Tier Nr.1 H.mur	6	47,36
	Tier Nr.2 H.mur	14	7,64
	Tier Nr.3 H.mur	22	12,17

Probenmaterial	Tier	Probennummer	Helicobacter/ng DNA
	Sent. 1 NMRI	30	0,00
	Sent. 2 NMRI	38	0,00
	Sent. 1 SCID	46	0,00
	Sent. 2 SCID	54	0,00
Zeitlicher Verlauf Tag 7 H.mur - Colon prox.	Tier Nr.1 H.mur	7	0,09
	Tier Nr.2 H.mur	15	0,20
	Tier Nr.3 H.mur	23	0,14
	Sent. 1 NMRI	31	0,00
	Sent. 2 NMRI	39	0,00
	Sent. 1 SCID	47	0,01
	Sent. 2 SCID	55	0,00
Zeitlicher Verlauf Tag 7 H.mur - Kot	Tier Nr.1 H.mur	8	0,02
	Tier Nr.2 H.mur	16	0,36
	Tier Nr.3 H.mur	24	0,32
	Sent. 1 NMRI	32	0,00
	Sent. 2 NMRI	40	0,00
	Sent. 1 SCID	48	0,00
	Sent. 2 SCID	56	0,01
Zeitlicher Verlauf Tag 14 H.bilis - Leber	Tier Nr.1 H.bilis	1	0,00
	Tier Nr.2 H.bilis	9	0,00
	Tier Nr.3 H.bilis	17	0,01
	Sent. 1 NMRI	25	0,00
	Sent. 2 NMRI	33	0,00
	Sent. 1 SCID	41	0,00
	Sent. 2 SCID	49	0,00
Zeitlicher Verlauf Tag 14 H.bilis - Fundus	Tier Nr.1 H.bilis	2	0,00
	Tier Nr.2 H.bilis	10	0,00
	Tier Nr.3 H.bilis	18	0,00
	Sent. 1 NMRI	26	0,00
	Sent. 2 NMRI	34	0,00
	Sent. 1 SCID	42	0,00
	Sent. 2 SCID	50	0,00
Zeitlicher Verlauf Tag 14 H.bilis - Duodenum	Tier Nr.1 H.bilis	3	0,00
	Tier Nr.2 H.bilis	11	0,00
	Tier Nr.3 H.bilis	19	0,00
	Sent. 1 NMRI	27	0,00
	Sent. 2 NMRI	35	0,00

Probenmaterial	Tier	Probennummer	Helicobacter/ng DNA
	Sent. 1 SCID	43	0,00
	Sent. 2 SCID	51	0,00
Zeitlicher Verlauf Tag 14 H.bilis - Jejunum prox.	Tier Nr.1 H.bilis	4	0,00
	Tier Nr.2 H.bilis	12	0,00
	Tier Nr.3 H.bilis	20	0,00
	Sent. 1 NMRI	28	0,00
	Sent. 2 NMRI	36	0,00
	Sent. 1 SCID	44	0,00
	Sent. 2 SCID	52	0,01
Zeitlicher Verlauf Tag 14 H.bilis - Ileum	Tier Nr.1 H.bilis	5	0,00
	Tier Nr.2 H.bilis	13	0,00
	Tier Nr.3 H.bilis	21	0,00
	Sent. 1 NMRI	29	0,00
	Sent. 2 NMRI	37	0,00
	Sent. 1 SCID	45	0,00
	Sent. 2 SCID	53	0,01
Zeitlicher Verlauf Tag 14 H.bilis - Caecum	Tier Nr.1 H.bilis	6	16,52
	Tier Nr.2 H.bilis	14	42,79
	Tier Nr.3 H.bilis	22	86,83
	Sent. 1 NMRI	30	0,00
	Sent. 2 NMRI	38	0,00
	Sent. 1 SCID	46	0,00
	Sent. 2 SCID	54	1,96
Zeitlicher Verlauf Tag 14 H.bilis - Colon prox.	Tier Nr.1 H.bilis	7	0,19
	Tier Nr.2 H.bilis	15	2,18
	Tier Nr.3 H.bilis	23	0,41
	Sent. 1 NMRI	31	0,00
	Sent. 2 NMRI	39	0,00
	Sent. 1 SCID	47	0,00
	Sent. 2 SCID	55	0,17
Zeitlicher Verlauf Tag 14 H.bilis - Kot	Tier Nr.1 H.bilis	8	0,75
	Tier Nr.2 H.bilis	16	14,19
	Tier Nr.3 H.bilis	24	2,41
	Sent. 1 NMRI	32	0,00
	Sent. 2 NMRI	40	0,00
	Sent. 1 SCID	48	0,00
	Sent. 2 SCID	56	0,01

Probenmaterial	Tier	Probennummer	Helicobacter/ng DNA
Zeitlicher Verlauf Tag 14 H.hep - Leber	Tier Nr.1 H.hep	1	0,00
	Tier Nr.2 H.hep	9	0,00
	Tier Nr.3 H.hep	17	0,00
	Sent. 1 NMRI	25	0,00
	Sent. 2 NMRI	33	0,00
	Sent. 1 SCID	41	0,00
	Sent. 2 SCID	49	0,00
Zeitlicher Verlauf Tag 14 H.hep - Fundus	Tier Nr.1 H.hep	2	0,00
	Tier Nr.2 H.hep	10	0,00
	Tier Nr.3 H.hep	18	0,00
	Sent. 1 NMRI	26	0,00
	Sent. 2 NMRI	34	0,00
	Sent. 1 SCID	42	0,00
	Sent. 2 SCID	50	0,00
Zeitlicher Verlauf Tag 14 H.hep - Duodenum	Tier Nr.1 H.hep	3	0,00
	Tier Nr.2 H.hep	11	0,01
	Tier Nr.3 H.hep	19	0,00
	Sent. 1 NMRI	27	0,00
	Sent. 2 NMRI	35	0,00
	Sent. 1 SCID	43	0,00
	Sent. 2 SCID	51	0,00
Zeitlicher Verlauf Tag 14 H.hep - Jejunum prox.	Tier Nr.1 H.hep	4	0,00
	Tier Nr.2 H.hep	12	0,00
	Tier Nr.3 H.hep	20	0,00
	Sent. 1 NMRI	28	0,00
	Sent. 2 NMRI	36	0,00
	Sent. 1 SCID	44	0,00
	Sent. 2 SCID	52	0,00
Zeitlicher Verlauf Tag 14 H.hep - Ileum	Tier Nr.1 H.hep	5	0,00
	Tier Nr.2 H.hep	13	0,00
	Tier Nr.3 H.hep	21	0,00
	Sent. 1 NMRI	29	0,00
	Sent. 2 NMRI	37	0,00
	Sent. 1 SCID	45	0,00
	Sent. 2 SCID	53	0,00
Zeitlicher Verlauf Tag 14 H.hep - Caecum	Tier Nr.1 H.hep	6	354,37
	Tier Nr.2 H.hep	14	210,86
	Tier Nr.3 H.hep	22	333,42

Probenmaterial	Tier	Probennummer	Helicobacter/ng DNA
	Sent. 1 NMRI	30	0,00
	Sent. 2 NMRI	38	0,00
	Sent. 1 SCID	46	2,87
	Sent. 2 SCID	54	7,40
Zeitlicher Verlauf Tag 14 H.hep - Colon prox.	Tier Nr.1 H.hep	7	22,88
	Tier Nr.2 H.hep	15	6,47
	Tier Nr.3 H.hep	23	1,31
	Sent. 1 NMRI	31	0,00
	Sent. 2 NMRI	39	0,00
	Sent. 1 SCID	47	0,00
	Sent. 2 SCID	55	0,03
Zeitlicher Verlauf Tag 14 H.hep - Kot	Tier Nr.1 H.hep	8	265,31
	Tier Nr.2 H.hep	16	254,37
	Tier Nr.3 H.hep	24	3,45
	Sent. 1 NMRI	32	0,00
	Sent. 2 NMRI	40	0,00
	Sent. 1 SCID	48	0,00
	Sent. 2 SCID	56	0,21
Zeitlicher Verlauf Tag 14 H.mur - Leber	Tier Nr.1 H.mur	1	0,00
	Tier Nr.2 H.mur	9	0,00
	Tier Nr.3 H.mur	17	0,00
	Sent. 1 NMRI	25	0,01
	Sent. 2 NMRI	33	0,30
	Sent. 1 SCID	41	0,00
	Sent. 2 SCID	49	0,00
Zeitlicher Verlauf Tag 14 H.mur - Fundus	Tier Nr.1 H.mur	2	0,24
	Tier Nr.2 H.mur	10	0,00
	Tier Nr.3 H.mur	18	0,01
	Sent. 1 NMRI	26	0,00
	Sent. 2 NMRI	34	0,00
	Sent. 1 SCID	42	0,01
	Sent. 2 SCID	50	0,01
Zeitlicher Verlauf Tag 14 H.mur - Duodenum	Tier Nr.1 H.mur	3	0,97
	Tier Nr.2 H.mur	11	0,16
	Tier Nr.3 H.mur	19	0,05
	Sent. 1 NMRI	27	0,01
	Sent. 2 NMRI	35	0,06
	Sent. 1 SCID	43	0,02

Probenmaterial	Tier	Probennummer	Helicobacter/ng DNA
	Sent. 2 SCID	51	0,00
Zeitlicher Verlauf Tag 14 H.mur - Jejunum prox.	Tier Nr.1 H.mur	4	1,12
	Tier Nr.2 H.mur	12	0,01
	Tier Nr.3 H.mur	20	0,01
	Sent. 1 NMRI	28	0,02
	Sent. 2 NMRI	36	0,23
	Sent. 1 SCID	44	0,01
	Sent. 2 SCID	52	0,02
Zeitlicher Verlauf Tag 14 H.mur - Ileum	Tier Nr.1 H.mur	5	0,27
	Tier Nr.2 H.mur	13	0,80
	Tier Nr.3 H.mur	21	1,11
	Sent. 1 NMRI	29	0,12
	Sent. 2 NMRI	37	0,02
	Sent. 1 SCID	45	0,06
	Sent. 2 SCID	53	0,01
Zeitlicher Verlauf Tag 14 H.mur - Caecum	Tier Nr.1 H.mur	6	129,85
	Tier Nr.2 H.mur	14	38,34
	Tier Nr.3 H.mur	22	24,96
	Sent. 1 NMRI	30	0,00
	Sent. 2 NMRI	38	0,00
	Sent. 1 SCID	46	0,00
	Sent. 2 SCID	54	0,01
Zeitlicher Verlauf Tag 14 H.mur - Colon prox.	Tier Nr.1 H.mur	7	3,93
	Tier Nr.2 H.mur	15	0,70
	Tier Nr.3 H.mur	23	0,09
	Sent. 1 NMRI	31	0,01
	Sent. 2 NMRI	39	0,00
	Sent. 1 SCID	47	0,00
	Sent. 2 SCID	55	0,03
Zeitlicher Verlauf Tag 14 H.mur - Kot	Tier Nr.1 H.mur	8	5,05
	Tier Nr.2 H.mur	16	1,03
	Tier Nr.3 H.mur	24	0,19
	Sent. 1 NMRI	32	0,00
	Sent. 2 NMRI	40	0,02
	Sent. 1 SCID	48	0,00
	Sent. 2 SCID	56	0,03

Probenmaterial	Tier	Probennummer	Helicobacter/ng DNA
Zeitlicher Verlauf Tag 40 H.bilis - Leber	Tier Nr.1 H.bilis	1	0,00
	Tier Nr.2 H.bilis	9	0,01
	Tier Nr.3 H.bilis	17	0,00
	Sent. 1 NMRI	25	0,00
	Sent. 2 NMRI	33	0,01
	Sent. 1 SCID	41	0,00
	Sent. 2 SCID	49	0,00
Zeitlicher Verlauf Tag 40 H.bilis - Fundus	Tier Nr.1 H.bilis	2	0,01
	Tier Nr.2 H.bilis	10	0,00
	Tier Nr.3 H.bilis	18	0,01
	Sent. 1 NMRI	26	0,26
	Sent. 2 NMRI	34	0,29
	Sent. 1 SCID	42	0,00
	Sent. 2 SCID	50	0,00
Zeitlicher Verlauf Tag 40 H.bilis - Duodenum	Tier Nr.1 H.bilis	3	0,07
	Tier Nr.2 H.bilis	11	0,00
	Tier Nr.3 H.bilis	19	0,12
	Sent. 1 NMRI	27	1,60
	Sent. 2 NMRI	35	0,00
	Sent. 1 SCID	43	0,05
	Sent. 2 SCID	51	0,01
Zeitlicher Verlauf Tag 40 H.bilis - Jejunum prox.	Tier Nr.1 H.bilis	4	0,00
	Tier Nr.2 H.bilis	12	0,00
	Tier Nr.3 H.bilis	20	0,05
	Sent. 1 NMRI	28	0,89
	Sent. 2 NMRI	36	0,01
	Sent. 1 SCID	44	0,00
	Sent. 2 SCID	52	0,00
Zeitlicher Verlauf Tag 40 H.bilis - Ileum	Tier Nr.1 H.bilis	5	0,01
	Tier Nr.2 H.bilis	13	0,01
	Tier Nr.3 H.bilis	21	0,40
	Sent. 1 NMRI	29	0,00
	Sent. 2 NMRI	37	0,00
	Sent. 1 SCID	45	0,02
	Sent. 2 SCID	53	0,01
Zeitlicher Verlauf Tag 40 H.bilis - Caecum	Tier Nr.1 H.bilis	6	2080,12
	Tier Nr.2 H.bilis	14	56,78
	Tier Nr.3 H.bilis	22	350,53

Probenmaterial	Tier	Probennummer	Helicobacter/ng DNA
	Sent. 1 NMRI	30	0,00
	Sent. 2 NMRI	38	0,00
	Sent. 1 SCID	46	0,04
	Sent. 2 SCID	54	85,32
Zeitlicher Verlauf Tag 40 H.bilis - Colon prox.	Tier Nr.1 H.bilis	7	1,89
	Tier Nr.2 H.bilis	15	6,74
	Tier Nr.3 H.bilis	23	17,57
	Sent. 1 NMRI	31	0,00
	Sent. 2 NMRI	39	0,00
	Sent. 1 SCID	47	0,00
	Sent. 2 SCID	55	0,50
Zeitlicher Verlauf Tag 40 H.bilis - Kot	Tier Nr.1 H.bilis	8	407,04
	Tier Nr.2 H.bilis	16	55,46
	Tier Nr.3 H.bilis	24	49,51
	Sent. 1 NMRI	32	0,00
	Sent. 2 NMRI	40	0,01
	Sent. 1 SCID	48	0,00
	Sent. 2 SCID	56	38,02
Zeitlicher Verlauf Tag 40 H.hep - Leber	Tier Nr.1 H.hep	1	0,09
	Tier Nr.2 H.hep	9	0,01
	Tier Nr.3 H.hep	17	0,01
	Sent. 1 NMRI	25	0,12
	Sent. 2 NMRI	33	0,20
	Sent. 1 SCID	41	0,01
	Sent. 2 SCID	49	0,04
Zeitlicher Verlauf Tag 40 H.hep - Fundus	Tier Nr.1 H.hep	2	0,00
	Tier Nr.2 H.hep	10	0,00
	Tier Nr.3 H.hep	18	0,00
	Sent. 1 NMRI	26	0,03
	Sent. 2 NMRI	34	0,05
	Sent. 1 SCID	42	0,02
	Sent. 2 SCID	50	0,03
Zeitlicher Verlauf Tag 40 H.hep - Duodenum	Tier Nr.1 H.hep	3	0,03
	Tier Nr.2 H.hep	11	0,08
	Tier Nr.3 H.hep	19	0,20
	Sent. 1 NMRI	27	0,06
	Sent. 2 NMRI	35	0,37
	Sent. 1 SCID	43	2,66

Probenmaterial	Tier	Probennummer	Helicobacter/ng DNA
	Sent. 2 SCID	51	0,05
Zeitlicher Verlauf Tag 40 H.hep - Jejunum prox.	Tier Nr.1 H.hep	4	0,00
	Tier Nr.2 H.hep	12	0,00
	Tier Nr.3 H.hep	20	0,14
	Sent. 1 NMRI	28	0,98
	Sent. 2 NMRI	36	0,06
	Sent. 1 SCID	44	9,60
	Sent. 2 SCID	52	0,05
Zeitlicher Verlauf Tag 40 H.hep - Ileum	Tier Nr.1 H.hep	5	0,00
	Tier Nr.2 H.hep	13	0,02
	Tier Nr.3 H.hep	21	0,05
	Sent. 1 NMRI	29	0,06
	Sent. 2 NMRI	37	4,66
	Sent. 1 SCID	45	0,03
	Sent. 2 SCID	53	0,77
Zeitlicher Verlauf Tag 40 H.hep - Caecum	Tier Nr.1 H.hep	6	1130,55
	Tier Nr.2 H.hep	14	2487,67
	Tier Nr.3 H.hep	22	1677,49
	Sent. 1 NMRI	30	837,65
	Sent. 2 NMRI	38	77,44
	Sent. 1 SCID	46	1440,89
	Sent. 2 SCID	54	299,24
Zeitlicher Verlauf Tag 40 H.hep - Colon prox.	Tier Nr.1 H.hep	7	2,02
	Tier Nr.2 H.hep	15	3,35
	Tier Nr.3 H.hep	23	2,28
	Sent. 1 NMRI	31	1,01
	Sent. 2 NMRI	39	11,07
	Sent. 1 SCID	47	6,36
	Sent. 2 SCID	55	3,62
Zeitlicher Verlauf Tag 40 H.hep - Kot	Tier Nr.1 H.hep	8	82,09
	Tier Nr.2 H.hep	16	353,94
	Tier Nr.3 H.hep	24	1941,02
	Sent. 1 NMRI	32	161,02
	Sent. 2 NMRI	40	312,39
	Sent. 1 SCID	48	518,15
	Sent. 2 SCID	56	317,14

Probenmaterial	Tier	Probennummer	Helicobacter/ng DNA
Zeitlicher Verlauf Tag 40 H.mur - Leber	Tier Nr.1 H.mur	1	0,00
	Tier Nr.2 H.mur	9	0,04
	Tier Nr.3 H.mur	17	0,00
	Sent. 1 NMRI	25	0,00
	Sent. 2 NMRI	33	0,00
	Sent. 1 SCID	41	0,00
	Sent. 2 SCID	49	0,00
Zeitlicher Verlauf Tag 40 H.mur - Fundus	Tier Nr.1 H.mur	2	0,00
	Tier Nr.2 H.mur	10	0,00
	Tier Nr.3 H.mur	18	0,00
	Sent. 1 NMRI	26	0,00
	Sent. 2 NMRI	34	0,00
	Sent. 1 SCID	42	0,00
	Sent. 2 SCID	50	0,00
Zeitlicher Verlauf Tag 40 H.mur - Duodenum	Tier Nr.1 H.mur	3	0,00
	Tier Nr.2 H.mur	11	0,00
	Tier Nr.3 H.mur	19	0,00
	Sent. 1 NMRI	27	0,01
	Sent. 2 NMRI	35	0,03
	Sent. 1 SCID	43	0,17
	Sent. 2 SCID	51	0,03
Zeitlicher Verlauf Tag 40 H.mur - Jejunum prox.	Tier Nr.1 H.mur	4	0,00
	Tier Nr.2 H.mur	12	0,00
	Tier Nr.3 H.mur	20	0,01
	Sent. 1 NMRI	28	0,05
	Sent. 2 NMRI	36	0,03
	Sent. 1 SCID	44	0,00
	Sent. 2 SCID	52	0,04
Zeitlicher Verlauf Tag 40 H.mur - Ileum	Tier Nr.1 H.mur	5	0,85
	Tier Nr.2 H.mur	13	0,99
	Tier Nr.3 H.mur	21	0,24
	Sent. 1 NMRI	29	0,00
	Sent. 2 NMRI	37	0,00
	Sent. 1 SCID	45	686,77
	Sent. 2 SCID	53	0,00
Zeitlicher Verlauf Tag 40	Tier Nr.1 H.mur	6	159,19

Probenmaterial	Tier	Probennummer	Helicobacter/ng DNA
H.mur - Caecum	Tier Nr.2 H.mur	14	40,06
	Tier Nr.3 H.mur	22	28,54
	Sent. 1 NMRI	30	0,00
	Sent. 2 NMRI	38	0,00
	Sent. 1 SCID	46	0,00
	Sent. 2 SCID	54	0,00
Zeitlicher Verlauf Tag 40 H.mur - Colon prox.	Tier Nr.1 H.mur	7	1,94
	Tier Nr.2 H.mur	15	5,37
	Tier Nr.3 H.mur	23	1,95
	Sent. 1 NMRI	31	0,00
	Sent. 2 NMRI	39	0,00
	Sent. 1 SCID	47	1,84
Zeitlicher Verlauf Tag 40 H.mur - Kot	Sent. 2 SCID	55	0,00
	Tier Nr.1 H.mur	8	1,37
	Tier Nr.2 H.mur	16	6,24
	Tier Nr.3 H.mur	24	7,12
	Sent. 1 NMRI	32	0,00
	Sent. 2 NMRI	40	0,00
	Sent. 1 SCID	48	13,55
	Sent. 2 SCID	56	0,00

Tabelle 6-2

7 Literaturverzeichnis

Battles, J. K., Williamson, J. C., Pike, K. M., Gorelick, P. L., Ward, J. M., and Gonda, M. A. (1995). Diagnostic Assay for *Helicobacter hepaticus* Based on Nucleotide Sequence of Its 16S rRNA Gene. *Journal of Clinical Microbiology* 33, 1344-1347.

Beckwith, C. S., Franklin, C. L., Hook, R. R., Jr., Besch-Williford, C. L., and Riley, L. K. (1997). Fecal PCR assay for diagnosis of *Helicobacter* infection in laboratory rodents. *Journal of Clinical Microbiology* 35, 1620-1623.

Bohr, U. R., Primus, A., Zagoura, A., Glasbrenner, B., Wex, T., and Malfertheiner, P. (2002). A group-specific PCR assay for the detection of *Helicobacteraceae* in human gut. *Helicobacter* 7, 378-383.

Boot, R., Bakker, R. H., Thuis, H., Veenema, J. L., and De Hoog, H. (1993). An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for monitoring rodent colonies for *Streptobacillus moniliformis* antibodies. *Laboratory Animals* 27, 350-357.

Burich, A., Hershberg, R., Waggle, K., Zeng, W., Brabb, T., Westrich, G., Viney, J. L., and Maggio-Price, L. (2001). *Helicobacter*-induced inflammatory bowel disease in IL-10- and T cell-deficient mice. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal & Liver Physiology* 281, G764-778.

Correa, P., and Miller, M. J. (1995). *Helicobacter pylori* and gastric atrophy--cancer paradoxes.[comment]. *Journal of the National Cancer Institute* 87, 1731-1732.

Debongnie, J. C., Pauwels, S., Raat, A., de Meeus, Y., Haot, J., and Mainguet, P. (1991). Quantification of *Helicobacter pylori* infection in gastritis and ulcer disease using a simple and rapid carbon-14-urea breath test. *Journal of Nuclear Medicine* 32, 1192-1198.

Dent, J. C., and McNulty, C. A. (1988). Evaluation of a new selective medium for *Campylobacter pylori*. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* 7, 555-558.

Dewhirst, F. E., Seymour, C., Fraser, G. J., Paster, B. J., and Fox, J. G. (1994). Phylogeny of *Helicobacter* isolates from bird and swine feces and description of *Helicobacter pametensis* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* 44, 553-560.

Diwan, B. A., Ward, J. M., Ramljak, D., and Anderson, L. M. (1997). Promotion by *Helicobacter hepaticus*-induced hepatitis of hepatic tumors initiated by N-nitrosodimethylamine in male A/JCr mice. *Toxicologic Pathology* 25, 597-605.

Drazenovich, N. L., Franklin, C. L., Livingston, R. S., and Besselsen, D. G. (2002). Detection of rodent *Helicobacter* spp. by use of fluorogenic nuclease polymerase chain reaction assays. *Comparative Medicine* 52, 347-353.

- Feldman, R. A., Eccersley, A. J., and Hardie, J. M. (1998). Epidemiology of *Helicobacter pylori*: acquisition, transmission, population prevalence and disease-to-infection ratio. *British Medical Bulletin* 54, 39-53.
- Feng, S., Hodzic, E., Kendall, L. V., Smith, A., Freet, K., and Barthold, S. W. (2002). Cloning and expression of a *Helicobacter bilis* immunoreactive protein. *Clinical & Diagnostic Laboratory Immunology* 9, 627-632.
- Fox, J. G., Dewhirst, F. E., Tully, J. G., Paster, B. J., Yan, L., Taylor, N. S., Collins, M. J., Jr., Gorelick, P. L., and Ward, J. M. (1994). *Helicobacter hepaticus* sp. nov., a microaerophilic bacterium isolated from livers and intestinal mucosal scrapings from mice. *Journal of Clinical Microbiology* 32, 1238-1245.
- Fox, J. G., Handt, L., Sheppard, B. J., Xu, S., Dewhirst, F. E., Motzel, S., and Klein, H. (2001). Isolation of *Helicobacter cinaedi* from the colon, liver, and mesenteric lymph node of a rhesus monkey with chronic colitis and hepatitis. *Journal of Clinical Microbiology* 39, 1580-1585.
- Fox, J. G., Li, X., Yan, L., Cahill, R. J., Hurley, R., Lewis, R., and Murphy, J. C. (1996). Chronic proliferative hepatitis in A/JCr mice associated with persistent *Helicobacter hepaticus* infection: a model of helicobacter-induced carcinogenesis. *Infection & Immunity* 64, 1548-1558.
- Fox, J. G., Yan, L. L., Dewhirst, F. E., Paster, B. J., Shames, B., Murphy, J. C., Hayward, A., Belcher, J. C., and Mendes, E. N. (1995). *Helicobacter bilis* sp. nov., a novel *Helicobacter* species isolated from bile, livers, and intestines of aged, inbred mice. *Journal of Clinical Microbiology* 33, 445-454.
- Franklin, C. L., Beckwith, C. S., Livingston, R. S., Riley, L. K., Gibson, S. V., Besch-Williford, C. L., and Hook, R. R., Jr. (1996). Isolation of a novel *Helicobacter* species, *Helicobacter cholecystus* sp. nov., from the gallbladders of Syrian hamsters with cholangiofibrosis and centrilobular pancreatitis. *Journal of Clinical Microbiology* 34, 2952-2958.
- Franklin, C. L., Riley, L. K., Livingston, R. S., Beckwith, C. S., Besch-Williford, C. L., and Hook, R. R., Jr. (1998). Enterohepatic lesions in SCID mice infected with *Helicobacter bilis*. *Laboratory Animal Science* 48, 334-339.
- Gebhart, C. J., Fennell, C. L., Murtaugh, M. P., and Stamm, W. E. (1989). *Campylobacter cinaedi* is normal intestinal flora in hamsters. *Journal of Clinical Microbiology* 27, 1692-1694.
- Goodwin, C. S., Blincow, E. D., Warren, J. R., Waters, T. E., Sanderson, C. R., and Easton, L. (1985). Evaluation of cultural techniques for isolating *Campylobacter pyloridis* from endoscopic biopsies of gastric mucosa. *Journal of Clinical Pathology* 38, 1127-1131.
- Graham, D. Y., Klein, P. D., Evans, D. J., Jr., Evans, D. G., Alpert, L. C., Opekun, A. R., and Boutton, T. W. (1987). *Campylobacter pylori* detected noninvasively by the ¹³C-urea breath test. *Lancet* 1, 1174-1177.

- Hachem, C. Y., Clarridge, J. E., Evans, D. G., and Graham, D. Y. (1995). Comparison of agar based media for primary isolation of *Helicobacter pylori*. *Journal of Clinical Pathology* 48, 714-716.
- Haines, D. C., Gorelick, P. L., Battles, J. K., Pike, K. M., Anderson, R. J., Fox, J. G., Taylor, N. S., Shen, Z., Dewhirst, F. E., Anver, M. R., and Ward, J. M. (1998). Inflammatory large bowel disease in immunodeficient rats naturally and experimentally infected with *Helicobacter bilis*. *Veterinary Pathology* 35, 202-208.
- He, Q., Wang, J. P., Osato, M., and Lachman, L. B. (2002). Real-time quantitative PCR for detection of *Helicobacter pylori*. *Journal of Clinical Microbiology* 40, 3720-3728.
- Heid, C. A., Stevens, J., Livak, K. J., and Williams, P. M. (1996). Real time quantitative PCR. *Genome Research* 6, 986-994.
- Hodzic, E., McKisic, M., Feng, S., and Barthold, S. W. (2001). Evaluation of diagnostic methods for *Helicobacter bilis* infection in laboratory mice. *Comparative Medicine* 51, 406-412.
- Jiang, H. Q., Kushnir, N., Thurnheer, M. C., Bos, N. A., and Cebra, J. J. (2002). Monoassociation of SCID mice with *Helicobacter muridarum*, but not four other enterics, provokes IBD upon receipt of T cells. *Gastroenterology* 122, 1346-1354.
- Kiehlbauch, J. A., Brenner, D. J., Cameron, D. N., Steigerwalt, A. G., Makowski, J. M., Baker, C. N., Patton, C. M., and Wachsmuth, I. K. (1995). Genotypic and Phenotypic Characterisation on *Helicobacter cinaedi* and *Helicobacter fennelliae* Strains Isolated from Humans and Animals. *Journal of Clinical Microbiology* 33, 2940-2947.
- Kosunen, T. U., Seppala, K., Sarna, S., and Sipponen, P. (1992). Diagnostic value of decreasing IgG, IgA, and IgM antibody titres after eradication of *Helicobacter pylori*. [comment]. *Lancet* 339, 893-895.
- Lee, A., Phillips, M. W., O'Rourke, J. L., Paster, B. J., Dewhirst, F. E., Fraser, G. J., Fox, J. G., Sly, L. I., Romaniuk, P. J., and Trust, T. J. (1992). *Helicobacter muridarum* sp. nov., a microaerophilic helical bacterium with a novel ultrastructure isolated from the intestinal mucosa of rodents. *International Journal of Systematic Bacteriology* 42, 27-36.
- Li, X., Fox, J. G., Whary, M. T., Yan, L., Shames, B., and Zhao, Z. (1998). SCID/NCr mice naturally infected with *Helicobacter hepaticus* develop progressive hepatitis, proliferative typhlitis, and colitis. *Infection & Immunity* 66, 5477-5484.
- Livingston, R. S., Riley, L. K., Steffen, E. K., Besch-Williford, C. L., Hook, R. R., Jr., and Franklin, C. L. (1997). Serodiagnosis of *Helicobacter hepaticus* infection in mice by an enzyme-linked immunosorbent assay. *Journal of Clinical Microbiology* 35, 1236-1238.
- Mähler, M., Bedigian, H. G., Burgett, B. L., Bates, R. J., Hogan, M. E., and Sundberg, J. P. (1998). Comparison of Four Diagnostic Methods for Detection of *Helicobacter* Species in Laboratory Mice. *Laboratory Animal Science* 48, 85-91.

- Marchetti, M., Arico, B., Burroni, D., Figura, N., Rappuoli, R., and Ghiara, P. (1995). Development of a mouse model of *Helicobacter pylori* infection that mimics human disease.[comment]. *Science* 267, 1655-1658.
- Marshall, B. J., and Warren, J. R. (1984). Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet* 1, 1311-1315.
- Mishra, K. K., Srivastava, S., Dwivedi, P. P., Prasad, K. N., and Ayyagari, A. (2002). UreC PCR based diagnosis of *Helicobacter pylori* infection and detection of *cag A* gene in gastric biopsies. *Indian Journal of Pathology & Microbiology* 45, 31-37.
- Monteiro, L., Bonnemaïson, D., Vekris, A., Petry, K. G., Bonnet, J., Vidal, R., Cabrita, J., and Megraud, F. (1997). Complex polysaccharides as PCR inhibitors in feces: *Helicobacter pylori* model. *Journal of Clinical Microbiology* 35, 995-998.
- Queiroz, D. M., Contigli, C., Coimbra, R. S., Nogueira, A. M., Mendes, E. N., Rocha, G. A., and Moura, S. B. (1992). Spiral bacterium associated with gastric, ileal and caecal mucosa of mice. *Laboratory Animals* 26, 288-294.
- Riley, L. K., Franklin, C. L., Hook, R. R., Jr., and Besch-Williford, C. (1996). Identification of murine helicobacters by PCR and restriction enzyme analyses. *Journal of Clinical Microbiology* 34, 942-946.
- Schaedler, R. W., and Orcutt, R. P. (1983). The mouse in biomedical research, Vol Volume III (New York, Academic press).
- Shames, B., Fox, J. G., Dewhirst, F., Yan, L., Shen, Z., and Taylor, N. S. (1995). Identification of Widespread *Helicobacter hepaticus* Infection in Feces in Commercial Mouse Colonies by Culture and PCR Assay. *Journal of Clinical Microbiology* 33, 2968-2972.
- Shomer, N. H., Dangler, C. A., Schrenzel, M. D., and Fox, J. G. (1997). *Helicobacter bilis*-induced inflammatory bowel disease in scid mice with defined flora. *Infection & Immunity* 65, 4858-4864.
- Suerbaum, S., Josenhans, C., Sterzenbach, T., Drescher, B., Brandt, P., Bell, M., Droge, M., Fartmann, B., Fischer, H. P., Ge, Z., *et al.* (2003). The complete genome sequence of the carcinogenic bacterium *Helicobacter hepaticus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 7901-7906.
- Taylor, N. S., Fox, J. G., and Yan, L. (1995). In-vitro hepatotoxic factor in *Helicobacter hepaticus*, *H. pylori* and other *Helicobacter* species. *Journal of Medical Microbiology* 42, 48-52.
- Totten, P. A., Fennell, C. L., Tenover, F. C., Wezenberg, J. M., Perine, P. L., Stamm, W. E., and Holmes, K. K. (1985). *Campylobacter cinaedi* (sp. nov.) and *Campylobacter fennelliae* (sp. nov.): two new *Campylobacter* species associated with enteric disease in homosexual men. *Journal of Infectious Diseases* 151, 131-139.

Vandamme, P., Harrington, C. S., Jalava, K., and On, S. L. (2000). Misidentifying helicobacters: the *Helicobacter cinaedi* example. *Journal of Clinical Microbiology* 38, 2261-2266.

Ward, J. M., Anver, M. R., Haines, D. C., Melhorn, J. M., Gorelick, P., Yan, L., and Fox, J. G. (1996). Inflammatory large bowel disease in immunodeficient mice naturally infected with *Helicobacter hepaticus*. *Laboratory Animal Science* 46, 15-20.

Ward, J. M., Fox, J. G., Anver, M. R., Haines, D. C., George, C. V., Collins, M. J., Jr., Gorelick, P. L., Nagashima, K., Gonda, M. A., and Gilden, R. V. (1994). Chronic active hepatitis and associated liver tumors in mice caused by a persistent bacterial infection with a novel *Helicobacter* species. *Journal of the National Cancer Institute* 86, 1222-1227.

Whary, M. T., Cline, J. H., King, A. E., Hewes, K. M., Chojnacky, D., Salvarrey, A., and Fox, J. G. (2000). Monitoring sentinel mice for *Helicobacter hepaticus*, *H. rodentium*, and *H. bilis* infection by use of polymerase chain reaction analysis and serologic testing. *Comparative Medicine* 50, 436-443.

Wotherspoon, A. C., Doglioni, C., Diss, T. C., Pan, L., Moschini, A., de Boni, M., and Isaacson, P. G. (1993). Regression of primary low-grade B-cell gastric lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue type after eradication of *Helicobacter pylori*. [comment]. *Lancet* 342, 575-577.

Zenner, L. (1999). Pathology, diagnosis and epidemiology of the rodent *Helicobacter* infection. *Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases* 22, 41-61.

Danksagungen

Mein herzlicher Dank geht an...

Prof. Dr. Kurt Bürki für sein Referat und seine freundliche Unterstützung.

Prof. Dr. Max M. Wittenbrink für sein Korreferat.

Dr. Frank Bootz für die Überlassung des Themas und seine Betreuung.

die Firma Microbios für die finanzielle Unterstützung.

Dr. Louis Corboz für seine Hilfestellung bei der Anzucht der *Helicobacter*.

Prof. Dr. Andreas Pospischil für seine histopathologischen Untersuchungen.

Dr. Michael Mähler für seine kompetente Beratung und die Überlassung einiger Keime.

Dr. Urs Ziegler für die Anfertigung der elektronenmikroskopischen Aufnahmen.

Frau Marilena Zimmermann für die tatkräftige Unterstützung meiner Arbeit.

Dr. Paolo Cinelli für die anregenden Gespräche und seine Hilfestellungen.

Dr. Thomas Weber für den Erfahrungsaustausch und die Überlassung einiger Keime.

das gesamte Institut für Labortierkunde für die sehr angenehme und kollegiale Atmosphäre.